

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Erprobung von Real-Time-PCR-Genmarkern zur Detektion zirkulierender Tumorzellen im
peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dominik Michael Bräuer

aus
Augsburg

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: PD Dr. Oliver Stötzer

Prof. Dr. Christian Schindlbeck

Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Dr. med. univ. Ulrich Andergassen

Dr. rer. nat. Alexandra C. Kölbl

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2018

1	EINLEITUNG	1
1.1	Mammakarzinom der Frau	2
1.1.1	Epidemiologie	2
1.1.2	Risikofaktoren der Entstehung eines Mammakarzinoms	3
1.1.3	Histopathologie, Tumorcharakteristika und -klassifikation	4
1.1.4	Klinik, Diagnostik und Staging	8
1.1.5	Therapie des Mammakarzinoms	9
1.1.6	Prognose und Prädiktion	11
1.2	Metastasierung und Minimal Residual Disease	12
1.2.1	Epithelial-mesenchymale Transition	13
1.2.2	Tumoraussaat und biologischer Arrest des Tumors	16
1.2.3	Nachweis zirkulierender Tumorzellen	16
1.2.4	Aussagekraft zirkulierender Tumorzellen	17
1.3	Experimenteller Ansatz dieser Forschungsarbeit	18
1.3.1	Quantitative Real Time-Polymerase-Kettenreaktion	18
1.3.2	Markergene der Real Time-Polymerase-Kettenreaktion	22
1.4	Zielsetzung des experimentellen Ansatzes	23
2	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	Material	24
2.1.1	Geräte und Hilfsmittel	24
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	26
2.1.4	Zelllinie	27
2.1.5	Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion-TaqMan-Primer	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Zellkulturtechnik, Zellzahlbestimmung und Spiking	28
2.2.2	Blutprobenaufbereitung	29
2.2.3	RNA-Gewinnung	30
2.2.4	Reverse Transkription	32
2.2.5	Real Time-Polymerase-Kettenreaktion	32
2.2.6	Ergebnisauswertung	33
3	ERGEBNISSE	34
3.1	Auswertung des Modellsystems	34
3.2	Patientendaten	41
3.3	Vergleich der Genexpression: adjuvante Situation vs. Negativkontrolle	43
3.4	Real Time-PCR-Ergebnisse adjuvanter Brustkrebspatientinnen	44
3.4.1	Genexpression und Tumorcharakteristika	45
3.4.2	Triple-negativer Primarius und Genexpression	46
3.4.3	Cathepsin L2-Hochregulation	46
3.4.4	Ki-67-Nachweis	47
3.4.5	Her2-Switch	48
3.4.6	Statistische Auswertung	49

4	DISKUSSION	50
4.1	Methodischer Ansatz	50
4.2	Epithelial-mesenchymale Transition	51
4.3	Heterogenität des Primärtumors	52
4.4	Detektion und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen	53
4.5	Her2-Switch	55
5	RESÜMEE	57
6	ZUSAMMENFASSUNG	58
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	60
8	LITERATURVERZEICHNIS	61
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	80
10	TABELLENVERZEICHNIS	81
11	ETHIKVOTUM	82
12	VERÖFFENTLICHUNG	83
13	DANKSAGUNG	84
14	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	85

1 Einleitung

Die Diagnose einer Krebserkrankung stellt für die Betroffenen unverändert einen schweren Schicksalsschlag dar. Für Frauen in Deutschland wie auch in der ganzen Welt ist dies in der Mehrzahl der Fälle die Diagnose Brustkrebs.

Für die Forschung in der Medizin beinhaltet das Streben nach Fortschritt auf dem Feld der Onkologie dabei ebenfalls große Herausforderungen angesichts der Komplexität der damit verbundenen biologischen Prozesse und Phänomene. Nichtsdestotrotz erlaubt es die moderne onkologische Diagnostik bereits heute, mittels genetischer und molekularbiologischer Verfahren weitere Kenntnisse über die Eigenschaften des Karzinoms zu gewinnen.

In Zuge dieser immer weiter entwickelten Diagnostik eröffnet sich das Potential, die Therapie des Mammakarzinoms mehr und mehr den Gegebenheiten der jeweiligen Patientensituation anzupassen, verbunden mit der Hoffnung einer verbesserten Prognose und Lebenszeitverlängerung für die Patientinnen.

Hierbei ist es von besonderem Interesse, ein vertieftes Verständnis für das Wesen der minimalen Resterkrankung zu erhalten. Die unter diesem Begriff verstandene Streuung, Zirkulation und Absiedlung von Tumorzellen mag einen wesentlichen Grund für Tumorprogression, Metastasierung und Krankheitsrezidiv darstellen, was den vorgenannten Zielen der Patientenversorgung entgegensteht.

Unter Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion können diese zirkulierenden Tumorzellen aus einer Blutprobe detektiert und der Versuch einer Charakterisierung unternommen werden. In der Gesamtschau der Eigenschaften des Primarius sowie der identifizierten Eigenschaften der im peripheren Blut zirkulierenden Tumorzellen ergibt sich somit ein umfassenderes Bild der Krebserkrankung, sodass die Möglichkeit einer Adjustierung der Therapie und des Gewinnens von prädiktiver wie prognostischer Aussagekraft über den weiteren Krankheitsverlauf besteht.

Man mag sich durch diesen Erkenntnisgewinn, der in der Folge auf Entscheidungen und Maßnahmen Einfluss nehmen kann, eine unmittelbare Verbesserung in der Betreuung von Patientinnen mit Mammakarzinom erhoffen.

1.1 Mammakarzinom der Frau

1.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2012 war Brustkrebs mit etwa 1.700.000 Erkrankungsfällen und 522.000 Todesfällen weltweit die häufigste Tumorerkrankung der Frau. Diese Zahlen stehen für 25% aller Krebsbehandlungsfälle und 15% aller Krebs-verursachten Todesfälle bei Frauen [6]. In der Erfassung des Jahres 2016 stellen 3.560.570 Brustkrebspatientinnen mit mehr als 40% die größte Population der Überlebenden einer Krebserkrankung in den USA dar [7].

Nach den Daten des durch das Robert Koch-Institut vorgelegten *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016* nimmt das Mammakarzinom analog dazu weiterhin die Stelle der am meisten vorherrschenden Krebserkrankung der Frau ein [8]. Unter 229.920 krebsneuerkrankten Frauen in Deutschland beträgt die Inzidenz des Brustkrebses für das Jahr 2013 dabei 71.640 Frauen mit einem mittleren Erkrankungsalter von 64,3 Jahren. Die 5-Jahres-Prävalenz weist der Bericht mit 315.740 Frauen aus, die 10-Jahres-Prävalenz mit 551.960. Während der Trend der Inzidenz für die Jahre 2003 bis 2013 mit +1,3% angegeben wird, beläuft sich der Trend der Sterbefälle für den gleichen Betrachtungszeitraum auf -1,2%, wobei im Jahr 2013 17.853 Frauen an Brustkrebs verstorben sind. Das durchschnittliche relative 5-Jahres-Überleben lag für den Zeitraum von 2011 bis 2013 bei 88,0%, was eine Verbesserung um 2,4 Prozentpunkte gegenüber der Periode von 2006 bis 2008 darstellt [8].

Obgleich die Anzahl der Neuerkrankungen im Beobachtungszeitraum ansteigt, werden weniger fortgeschrittene Stadien der Tumorerkrankung diagnostiziert. Dies wird auf das Vorziehen des Diagnosezeitpunktes durch das in der Zeit von 2005 bis 2009 eingeführte Mammographie-Screening zurückgeführt [8]. Im Zusammenhang mit Überlebenszeitanalysen und der dabei festgestellten Verbesserung muss hierbei allerdings ein etwaiger *lead time bias* in Betracht gezogen werden. Dies ist der Fall, wenn lediglich der Diagnosezeitpunkt vorgezogen wird, aber die Therapie selbst keine Lebenszeitverlängerung zu bewirken vermag.

Neuerkrankungen	Frauen	Sterbefälle	Frauen
Absolute Zahl	71.6400	Absolute Zahl	17.853
Mittleres Erkrankungsalter	64,3	Mittleres Sterbealter	72,6
Rohe Rate	174,0	Rohe Rate	43,4
Altersstandardisierte Rate	119,3	Altersstandardisierte Rate	23,6
Aktueller Trend ¹	+1,3%	Aktueller Trend ¹	-1,2%
Prognose für 2020 (absolute Zahl)	77.600 ²		
Überleben		Prävalenz	
Relatives 5-Jahres-Überleben	88%	5-Jahres-Prävalenz	315.740
Relatives 10-Jahres-Überleben	82%	10-Jahres-Prävalenz	551.960

1 durchschnittliche jährliche Veränderung der altersstandardisierten Rate zwischen 2003 und 2013

2 unter der Annahme ab 2013 gleichbleibender Erkrankungsrate für Frauen zwischen 50 und 74 Jahren

Tabelle 1: Epidemiologische Kennzahlen für Brustkrebs, Deutschland, 2013 [8]

1.1.2 Risikofaktoren der Entstehung eines Mammakarzinoms

Zu der Entstehung eines Mammakarzinoms führende Faktoren wurden intensiv beleuchtet. So zeigte sich, dass zuvorderst Umstände im hormonellen System der Frau zu einer Krebserkrankung führen können. Eine umfangreiche Meta-Analyse über 100 epidemiologischer Studien ergab, dass zum einen ein langer hormonell-aktiver Zeitraum, einhergehend mit einer frühen Menarche und spät einsetzender Menopause, in der Ausbildung eines Karzinoms resultieren kann [9]. Zum anderen erhöhen Kinderarmut beziehungsweise -losigkeit [10], späte erste Geburt [11, 12] sowie kurze Stillzeiten das Risiko [13]. Darüber hinaus stellt Adipositas, vor allem in der Postmenopause, einen Risikofaktor dar [14], was mit der in den Adipozyten stattfindenden Aromataseproduktion und den damit verbunden erhöhten Östrogenspiegeln erklärt werden kann [15]. Gekoppelt daran ist das erhöhte Risiko eines Zweitmalignoms der kontralateralen Brust [16]. Was die Einnahme hormonhaltiger Kontrazeptiva angeht, hat sich bislang kein erhöhtes Risiko gezeigt [17]. Im Gegensatz hierzu gibt es allerdings ausreichend Daten, die belegen, dass eine Hormonersatztherapie mit Östrogenen ein erhöhtes Risiko darstellt [18, 19].

Weiterhin beeinflussen allgemeine Lebensstilfaktoren die Erkrankungswahrscheinlichkeit. Neben der schädigenden Wirkung des Nikotinkonsums [20, 21] geht ein ebenfalls negativer Effekt vom Genuss von Alkohol aus [22]. Weitere Studien legen nahe, dass sportliche Aktivität zu einer Risikoreduktion führen kann [23, 24]. Dies gelingt vornehmlich über die Verminderung der Dichte des Brustdrüsengewebes [25], da gerade von einer in der Mammographie erhöhten Gewebedichte ein weiteres Risiko ausgeht [26, 27]. Schließlich können auch Ernährungsgewohnheiten wie vermehrter

Fleischkonsum [28], zu hohe Cholesterinspiegel [29] oder eine nicht ausreichend ausgeglichene Diät daran beteiligt sein, zur Entstehung einer Krebserkrankung beizutragen [30].

Überdies besteht auch ein Erkrankungsrisiko, das sich aus einer genetischen Disposition ergibt. Man schätzt, dass 5-10% aller Brustkrebsfälle eine erbliche Komponente aufweisen [31]. Vornehmlich sind hierbei die BRCA1- und BRCA2-Mutationen zu nennen. Erstere wurden 1990 von Hall et al. auf Chromosom 17 entdeckt [32], Zweitere im Jahre 1994 auf Chromosom 13 [33]. Studien hierzu zeigen, dass mit Mutationen auf diesen Genloci Lebenszeitriskien für die Entwicklung eines Mammakarzinoms von 50-80%, für ein Karzinom der kontralateralen Brust von 60% sowie für die Ausbildung eines Ovarialkarzinoms von etwa 10-40% verbunden sind [34, 35]. Neben diesen Genen, die elementarer Bestandteil der Diagnostik sind und Therapieentscheidungen maßgeblich beeinflussen, richtet sich der Blick der Forschung auf das RAD51C-Gen, das ebenfalls eine Rolle im Tumorgeschehen der weiblichen Brust und der Ovarien hat [36].

Weiterhin besteht eine Vergesellschaftung mit anderen Karzinomen, wie eine im Jahr 2015 veröffentlichte Follow-up-Untersuchung von mehr als 10.000 Patientinnen illustriert [37]. Die Studie gibt ein um 30% erhöhtes Risiko eines Zweitmalignoms für Brustkrebspatientinnen an. Dabei sind insbesondere kolorektale Karzinome, Lymphome, das Endometrium-Karzinom wie das maligne Melanom und Nierenzellkarzinome festzustellen. In der Genese dieser bösartigen Neoplasien ist jedoch zu diskutieren und zu differenzieren, inwieweit diese in Zuge einer vorangegangenen Therapie oder aufgrund einer genetischen Veranlagung entstehen, was eine Entkopplung und Varianz in der Auftretensabfolge möglich machen kann.

1.1.3 Histopathologie, Tumorcharakteristika und -klassifikation

Bei etwa 95% aller Mammakarzinome handelt es sich histologisch um Adenokarzinome [38], die auf Milchdrüsen und -gänge zurückzuführen sind. Der häufigste Typ gemäß der im Jahr 2012 veröffentlichten vierten Auflage der WHO-Klassifikation der Mammatumoren, der dabei weitestgehend den ehemals verwendeten Terminus des *invasiven duktales Karzinoms* ersetzt, ist das *invasive Karzinom, kein spezieller Typ / no special type / NST* mit bis zu 80% [38, 39]. Für die Zuweisung eines speziellen Typen bedarf es mehr als 90% charakteristischer morphologischer Muster im pathologischen Präparat [38]. Das *invasive lobuläre Karzinom* stellt dabei mit bis zu 15% die größte Gruppe dar [38, 39]. Neben bedeutend selteneren Typen führt die WHO-Klassifikation das tubuläre, das kribiforme, das muzinöse, das papilläre und das metaplastische Karzinom sowie Karzinome mit medullären Eigenschaften, mit apokriner oder siegelringzelliger Differenzierung an. Darüberhinaus liegen Mischtypen vor, "wenn der Anteil eines speziellen Typs 50% [...] übersteigt, aber 10-49% des Tumors kein spezialisiertes Muster aufweisen; d.h. gemischtes invasives Karzinom

NST und spezieller Typ (z.B. muzinös, lobulär)" [38]. Eine Besonderheit stellt das inflammatorische Mammakarzinom dar, das auf dem Grund einer malignen Entartung der Brust entstehen kann und sich als Lymphangiosis carcinomatosa präsentiert [40].

Risikoläsionen, die in ein invasives Wachstum übergehen können, stellen das duktales wie das lobuläre Carcinoma in situ, bei denen die Basalmembran jeweils noch nicht durchbrochen ist, sowie der Morbus Paget der Mamille dar, der sowohl mit Präkanzerosen als auch mit invasiven Karzinomen vergesellschaftet auftreten kann [41-43]. Studien zeigen zudem auf, dass Mammakarzinome Ausgang von benignen Erkrankungen und Veränderungen der Brust wie beispielsweise Papillomen, Fibroadenomen oder Hyperplasien nehmen können [44-46].

Im Weiteren beurteilt das Nottingham-Gradingssystem nach Elston und Ellis den Grad der Differenzierung des Tumors [47, 48]. Hierbei wird untersucht, inwieweit die Morphologie der wachsenden Tumormasse vom gesunden Ursprungsgewebe abweicht. Das Präparat wird hinsichtlich der Tubulusformation, dem Vorhandensein von nukleären Polymorphismen sowie der Anzahl der festzustellenden Mitosefiguren jeweils mit ein bis drei Punkten gewichtend bewertet und mündet in einen Score von drei bis neun Punkten, der sich in den Graden eins bis drei wiederfindet. Dabei gilt, je höher der Score, desto höher das Grading, desto weniger differenziert das Gewebe, desto schlechter die Prognose [47].

Punktebewertung des Merkmals	Ausbildung tubulärer Strukturen	Erscheinung nukleärer Polymorphismen	Anzahl Mitosefiguren* (pro 10 Gesichtsfelder)
1	>75% des Tumors	klein, regelmäßig geformt	<10
2	10-75% des Tumors	moderate Größenzunahme und Variabilität	10-19
3	<10% des Tumors	deutliche Größen- und Formveränderungen	>19
Grading in Addition der Punktebewertung pro Merkmal	1 \triangleq 3-5 Punkte (gut differenziert)	2 \triangleq 6-7 Punkte (mäßig differenziert)	3 \triangleq 8-9 Punkte (schlecht differenziert)

* abhängig von Mikroskop, Vergrößerung und Gesichtsfelddurchmesser

Tabelle 2: Differenzierungsgrad des Mammakarzinoms nach Elston und Ellis [48]

Eine weitere Aussage über die Zellteilungsaktivität und Proliferation des Tumors erlaubt die immunhistochemische Untersuchung des Proteins Ki-67, wodurch wiederum eine Einschätzung des Malignitätsgrades des Tumors gewonnen und eine bessere Prognoseabschätzung – auch in der Rezidivsituation – getroffen werden kann, was Veronese et al. bereits 1993 formulierten und in den letzten Jahren breite Unterstützung fand [49-54]. Damit gelingt durch diesen Parameter die Abfrage einer der wesentlichen Eigenschaften von Krebserkrankungen, wie sie im Jahr 2000 von Hanahan und Weinberg in *The Hallmarks of Cancer* formuliert wurden [55].

Darüber hinaus ermittelt die Immunhistochemie den Rezeptorstatus eines Mammakarzinoms, worunter man die Ausprägung des Vorhandenseins verschiedener Rezeptoren auf der Oberfläche der Tumorzellen des Karzinoms versteht. Diese können bei Positivität ebenfalls das Signal sein, das Tumorstadium induziert, und stellen somit einen wesentlichen Aspekt im Prozess der Entstehung von Krebs dar [49, 55]. Die Steroidrezeptoren für Östrogen und Progesteron sind seit mehr als 40 Jahren umfassender Bestandteil der Forschung [56, 57]. So beschäftigten sich Lippmann et al. bereits im Jahre 1976 mit dem Einfluss von Steroiden auf Brustkrebszelllinien [58]. Diese Forschungsbestrebungen wurden auch im Lichte der von George Beatson 1896 vorgenommenen Ovariectomie einer an fortgeschrittenem Brustkrebs erkrankten Patientin unternommen, bei der hierunter eine Tumorregression festzustellen war, und führte schließlich in den jüngeren Jahrzehnten zur Implementierung hormoneller Therapien, die spezifisch auf den Rezeptorstatus zugeschnitten sind [59]. Die Immunhistochemie ist heute die etablierte Methode der Wahl, um diesen zu erheben [60, 61]. Für die Kategorisierung der Rezeptorexpression bedient man sich dabei eines auf Allred et al. zurückgehenden Scores [50] oder des Immunreaktiven Scores nach Remmele [62]. 1987 wurde das Panel um den Abkömmling der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren Her2/neu erweitert und ist seitdem etablierter Teil der Erfassung des Rezeptorstatus [63]. Da Her2/neu und mit ihm verwandte Rezeptoren für Proliferation, Migration und Invasion von Tumorzellen verantwortlich sind, ist es unerlässlich, diesen Parameter bei der Charakterisierung der Tumorbilogie zu erfassen, um betroffene Patientinnen einer zielgerichteten Therapie zuführen zu können [64]. Diese Testung sollte daher bei jeder invasiven Tumorerkrankung erfolgen und bei unklarem Her2-Status eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung nach sich ziehen [65].

Auf Perou et al. zurückgehend lassen sich hierbei im Wesentlichen fünf molekulare Subtypen beschreiben, um die vorstehend erläuterten biologischen Merkmale für eine Risikostratifizierung heranzuziehen [66]. Durch die Bestimmung der Subgruppe des Karzinoms lässt sich neben der Gewinnung von Aussagen über die zu erwartende Prognose und den Verlauf der Erkrankung eine krankheitsadjustierte und damit möglichst effektive Therapie einleiten [67, 68]. Die in der Praxis verwendete Einteilung geht dabei auf Cheang und Hugh et al. zurück [69, 70].

Biomarker	Luminal A	Luminal B (Her2 positiv)	Luminal B (Her2 negativ)	Her2 (non-luminal)	Triple-negativ (basal-like)
Östrogenrezeptor	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ
Progesteronrezeptor	positiv	positiv/negativ	positiv/negativ	negativ	negativ
Her2/neu-Rezeptor	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Ki-67	<14%		>14%		

Tabelle 3: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms [69-72]

Sollte mittels dieser Annäherung an die Biologie des Tumors keine ausreichend befriedigende Erkenntnis hinsichtlich einer fundierten Therapieentscheidung im Sinne der Patientin gewonnen werden können, um die Erkrankung zielgerichtet mit einer (neo-)adjuvanten Therapie systemisch zu behandeln, so können weitere Genexpressionsanalysen zu Rate gezogen werden, was sich in der Empfehlung des St. Gallen-Konsensus von 2011 wiederfindet [73, 74].

Weiterhin konnten in jüngster Vergangenheit durch Studien über die Bestimmung des Urokinase-Plasminogen-Aktivators (uPA), eine durch Interaktion mit Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) an Metastasierung und Invasion von Krebszellen beteiligte Protease, Biomarker gefunden werden, die eine Prognose des Krankheitsverlauf ermöglichen und bei der Entscheidung helfen können, Patientinnen einer systemischen Therapie zuzuführen oder dies zu unterlassen [75].

Schließlich ist es neben Erfassung histologischer wie molekularbiologischer Charakteristika von eminenter Bedeutung, Größe und Ausmaß des Karzinoms zu ermitteln und dies in einer anatomischen Klassifikation festzuhalten, wobei man sich der TNM-Klassifikation bedient, die zudem Auskunft über den Lymphknotenstatus sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen gibt [76].

T		N		M	
Tx	nicht beurteilbarer Primarius	Nx	nicht beurteilbare regionäre Lymphknoten	M0	keine Fernmetastasen
T0	kein Anhalt für Primarius	N0	keine	cM0(i+)	klinisch/radiologisch keine Fernmetastasen, Nachweis disseminierter oder zirkulierender Tumorzellen
Tis	Carcinoma in situ	N1	1-3 axillär	M1	Fernmetastasen
T1	maximal 2cm	N2	4-9 axillär		
T1mic	bis 0,1cm	N3	10 und mehr, axillär und infraklavikulär		
T1a	bis 0,5cm				
T1b	bis 1cm				
T1c	bis 2cm				
T2	>2cm bis 5cm				
T3	>5cm				
T4	Befall der Thoraxwand oder der Haut				

Tabelle 4: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms [76]

Die Notation der TNM-Klassifikation kann um vorangestellte Buchstaben ergänzt werden [76]. Ein "c" steht dabei für eine klinische, sprich prätherapeutische Erfassung, ein "p" für die pathologische, sprich postoperative. Bei Staging nach durchgeführter neoadjuvanter Therapie mittels Chemo- oder Strahlentherapie wird der Klassifikation ein "y" vorangestellt, wobei nach anschließender postoperativer Versorgung die Zusätze bei Ermittlung des nun vorliegenden TNM-Stadiums zu "py" zusammengeführt werden.

1.1.4 Klinik, Diagnostik und Staging

Klinische Zeichen des Mammakarzinoms zeigen sich weitestgehend erst in einem fortgeschrittenen, invasiven Stadium der Erkrankung. Zuvorderst sind hierbei Verhärtungen und Knoten, Spannungen, Einziehungen und Veränderungen im Aspekt der Haut bis zur Inflammation, Mamillensekretion und Schmerzen zu nennen, deren Auftreten als klinisches Symptom bei Diagnosestellung in den meisten Studien abgefragt und in den Blick genommen wird [77-80]. Zudem ist insbesondere der axilläre Lymphknotenstatus zu erfassen. Was die Lokalisation des Tumors angeht, zeigen Untersuchungen, dass mehr als die Hälfte der Tumoren am oberen äußeren Quadranten der Brust zu finden sind [81, 82].

Auch wenn durch die regelmäßige Untersuchung der Brust sowohl durch die Patientin als auch den Arzt keine Senkung der Sterblichkeit belegt ist, so wird sie dennoch empfohlen, da sie Bewusstsein schafft, die Compliance zur Teilnahme an weiteren Screeningmaßnahmen sichert und Intervallkarzinome aufdecken kann [78, 83-85].

Die Auswertung der Ergebnisse großer europäischer Screeningprogramme unter Anwendung der Mammographie zeigte im Jahr 2012, dass durch diese Früherkennungsprogramme die Brustkrebssterblichkeit europaweit um 26% gesenkt werden konnte [86]. Das deutsche Programm, das Frauen im Alter zwischen 50 und 69 Jahren alle zwei Jahre zum Screening einlädt, weist dabei die größte Anzahl anspruchsberechtigter Frauen in Europa auf [83]. Für Mutationsträgerinnen und Patientinnen mit dem Risiko der familiären Belastung ist ein intensivierte Screening empfohlen, das zu einem früheren Lebensalter einsetzen sollte [87]. Bei eingeschränkter Beurteilbarkeit der Mammographie, beispielsweise aufgrund hoher Gewebedichte, und/oder Risikopatientinnen können die Sonographie der Brust sowie eine Magnetresonanztomographie als nutzenpositive diagnostische Instrumente ergänzend hinzugezogen werden, wobei eine Erhöhung der Rate falsch-positiver Patientinnen in Kauf genommen werden muss [88, 89]. Eine große Analyse der Mammographie-Programme aus den USA der Jahre 1996 bis 2008 zeigt, dass die Anzahl der im Anschluss an das Screening durchgeführten Biopsien über die Jahre konstant blieb, jedoch die Zahl der Carcinoma in situ sowie der invasiven Krebsstadien anstieg, wohingegen gutartige Veränderungen der Brust als Ergebnis der histologischen Untersuchungen rückläufig waren [90].

Für die Gewinnung des Probenmaterials bei abklärungsbedürftiger BI-RADS-Klassifizierung nach Befundung der Bildgebung stehen sowohl die Feinnadelbiopsie als auch die bevorzugt eingesetzte Stanz- oder Vakuumbiopsie zur Verfügung [91, 92]. Es zeigte sich, dass die Durchführung der Biopsie keinen Einfluss auf den Sentinel-Lymphknotenstatus hat [93, 94]. Sofern nicht im Rahmen einer präoperativen Untersuchung geschehen, ist abhängig von intraoperativer histologischer Schnellschnittdiagnostik und daraus resultierend möglichem Befall des Wächterlymphknotens das therapeutische Vorgehen anzupassen und die Operationsindikation zu erweitern [95, 96].

Bei Verdacht beziehungsweise histologischem Befund einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung sollte bereits präoperativ ein Staging durchgeführt werden, um eine mögliche Tumoraussaat zu detektieren. Dabei bedient man sich neben der körperlichen Untersuchung einer röntgenologischen Thoraxuntersuchung, der Sonographie der Leber sowie der Skelettszintigraphie, wobei dies um weitere Maßnahmen bei erhöhtem und zu präzisierendem Metastasenverdacht ergänzt werden kann [97]. Der Fokus liegt dabei darauf, Filiae in Lunge, Leber und Knochen als Prädilektionsstellen der systemischen Brustkrebserkrankung auszuschließen [98].

1.1.5 Therapie des Mammakarzinoms

Die Therapie des Mammakarzinoms ergibt sich neben den Ausmaßen der Tumormasse maßgeblich aus der Biologie und den Eigenschaften des Tumors, die Angriffspunkte für eine zielgerichtete Therapie bieten können.

Die moderne Gynäkologie hält operative, medikamentöse wie strahlentherapeutische Möglichkeiten zur Behandlung von Brustkrebs vor. Nach Möglichkeit sollte eine brusterhaltende Therapie der radikalen Mastektomie vorgezogen werden, wobei im Anschluss eine Radiatio erfolgen muss, um erhaltendes Brustdrüsengewebe ebenfalls einer Therapie zuzuführen [99]. Die adjuvante lokale Bestrahlung senkt dabei das Risiko eines intramammären Rezidivs [100]. Im Rahmen der etablierten Sentinel-Lymphonodektomie und der damit verbundenen Schnellschnittdiagnostik kann eine lymphogene Aussaat festgestellt und die Operation um eine Axilladisektion ausgeweitet werden, um einer weiteren Filialisierung des Tumors vorzubeugen [101, 102]. Neben dem histologischen Erkenntnisgewinn um die Erkrankung ermöglicht dieses schonende Verfahren des intraoperativen Stagings eine weit höhere Lebensqualität für die Patientinnen als die initiale Ausräumung sämtlicher Lymphknoten in der Achsel [103].

Um den Tumor medikamentös zu bekämpfen, stehen Chemotherapie sowie Antikörper- und endokrine Hormontherapie zur Verfügung. Die Chemotherapie wird in der Regel im Anschluss an die Operation durchgeführt oder kann neoadjuvant, um die Operationsbedingungen zu verbessern oder die Wahrscheinlichkeit eines verbesserten Outcomes zu erzielen, angewandt werden [104, 105]. Indikationen hierfür sind beispielsweise ein hohes Grading, negativer Hormonrezeptorstatus bei positivem Her2/neu-Status oder lymphogene Metastasen [106-108]. Gängige Therapieschemata sind dabei 5-Fluoruracil mit Adriamycin oder Epirubicin und Cyclophosphamid, was häufig um ein Taxan wie Paclitaxel ergänzt wird [109-111]. Zudem erschließt sich im Fall des metastasierten Mammakarzinoms eine palliative Therapieoption, wobei meist ein Taxan in Kombination mit einem Anthrazyklin zur Anwendung kommt [112-114]. Bei Her2/neu-Positivität des Tumors ist neben dem Einsatz von Zytostatika begleitend der monoklonale Antikörper Trastuzumab für ein Jahr indiziert [115]. Darüber hinaus erfolgt die endokrine Therapie bei positivem Hormonrezeptorstatus im Anschluss an die Chemotherapie. Prämenopausal ist hierbei der selektive Östrogen-Rezeptor-Modulator Tamoxifen für einen Zeitraum von fünf Jahren zu geben, der antagonistisch auf die Östrogenrezeptoren der weiblichen Brust wirkt [116]. Wichtig ist hierbei allerdings zu beachten, dass durch agonistische Wirkung an endometrialem Gewebe unter Tamoxifen-Therapie ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Endometriumkarzinoms und dabei im Erkrankungsfall ein schlechteres Outcome bestehen [117-119]. Zudem lässt sich durch die Gabe von LHRH-Agonisten wie Buserelin oder Goserelin via einer Überstimulation der Hypophyse und folgender Downregulation innerhalb des hormonellen Regelkreises eine verminderte Ausschüttung von FSH und LH herbeiführen und somit die Ovarialfunktion und der Sexualhormonhaushalt supprimieren [120, 121]. In der postmenopausalen Situation sollten Aromatasehemmer für fünf Jahre angesetzt werden, um die extraovarielle Hormonproduktion zu drosseln und die Östrogenrezeptoren nicht zu induzieren [122]. Hierbei kann auch eine kombinierte Therapie mit Tamoxifen angewendet werden [123].

Die Strahlentherapie, die immer ergänzend nach einer brusterhaltenden Operation erfolgen sollte, kann bei Inoperabilität oder in der palliativen Situation auch primär erfolgen [124-127]. Die adjuvante Radiatio ist auch nach einer Mastektomie angezeigt, wenn keine R0-Situation geschaffen werden konnte oder eine fortgeschrittene Tumorerkrankung vorliegt [100, 128]. Zur Linderung von Schmerzen und Eindämmung des Tumorwachstums ist die lokale Metastasenbestrahlung des Knochens oder Hirngewebes ebenfalls etabliert [124, 129, 130].

Im Anschluss an die Tumorchirurgie kann eine Rekonstruktion der Brust mit Eigengewebe oder Fremdmaterial erfolgen, was eine etwaige Mamillenrekonstruktion miteinschließt [131, 132]. Bereits ab Diagnosestellung sollte während des gesamten Krankheitserlebens der Patientin ein Angebot der biopsychosozialen Begleitung unterbreitet und dessen Inanspruchnahme gefördert werden [133, 134].

1.1.6 Prognose und Prädiktion

Neben Risikofaktoren, bei deren Vorliegen es mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Entstehung einer Krankheit kommen kann, können Prognosefaktoren, die Aussagen über den Krankheitsverlauf ableiten lassen, sowie Prädiktionsfaktoren, die eine Abschätzung für das Ansprechen einer eingeleiteten Therapie ermöglichen, identifiziert werden [135]. Für Therapieentscheidungen wie auch Maßnahmenauswahl und -interpretation im Rahmen der Nachsorge des Mammakarzinoms nehmen für diese Tumorentität etablierte Faktoren eine eminente Rolle ein.

Die Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie in der aktualisierten Fassung aus dem Jahr 2015 führen als Prognosefaktoren für das primäre Mammakarzinom zuvorderst Tumorgroße, Lymphknotenstatus, Vorliegen von Fernmetastasen, Histologie, Grading nach Elston und Ellis, Alter der Patientin sowie die pathologisch nachgewiesene Komplettremission nach neoadjuvanter Chemotherapie bei hochgradig Hormonrezeptor-positiven, Her2-positiven oder triple-negativen Tumoren auf [136]. Weitere prognostische Faktoren werden mit Adipositas, Hormonrezeptorstatus, Her2-Status, molekularem Subtyp, uPA und Ki-67 genannt. Wie auch im St. Gallen-Konsensus 2015 wird prognostische Verwertbarkeit für die kommerziell erhältlichen, multiparametrischen molekularen Markerassays Oncotype DX®, MammaPrint®, PAM-50®, EndoPredict® und Breast Cancer Index® festgestellt, wobei diese einem sorgfältig selektierten Patientenkollektiv empfohlen werden sollte, wenn die therapeutische Entscheidungsfindung auf der Grundlage anderer Kriterien schwierig ist [136, 137]. Gemäß den Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie liegt derzeit kein belegter allgemeiner Nutzen des Einsatzes zirkulierender Tumorzellen als Prognosefaktor des primären Mammakarzinoms vor, kann jedoch in der individuellen Patientensituation Aussagekraft gewinnen. Für die metastasierte Situation

hingegen liegt eine Empfehlung für die Zuhilfenahme zirkulierender Tumorzellen vor, um Aussagen über die Prognose und frühes Therapieansprechen zu erhalten [136].

Als Indikatoren für das erfolgreiche Ansprechen einer neoadjuvanten Chemotherapie lassen sich vornehmlich negativer Rezeptorstatus, Triple-Negativität und positiver Her2-Status heranziehen [68, 136, 137]. Ki-67 kann sowohl bei der Fragestellung hinsichtlich der neo- als auch der adjuvanten Chemotherapie als Prädiktor verwendet werden [51, 136, 137]. Bezüglich der molekularen Markerassays liegt derzeit nur für Oncotype DX® eine prädiktive Aussagekraft hinsichtlich des Nutzens einer Chemotherapie vor [137]. Gesichert prädiktive Faktoren für den Erfolg einer endokrinen Therapie stellen Hormonrezeptor- und Menopausenstatus dar; Alter und Lymphknotenstatus sowie Grading und Markerassay-Ergebnisse als prädiktive Faktoren werden diskutiert [136, 137]. Für eine Her2-zielgerichtete Therapie hat der Her2-Status unbestritten prädiktive Aussagekraft [136, 137].

Hieraus wird ersichtlich, dass ausgehend von der unmittelbaren Krankheitssituation der jeweiligen Patientin, auf der Grundlage diagnostischer Erkenntnisse und der vorliegenden Biologie des Tumors, stets individuell adaptiert Indikatoren zu Rate gezogen werden müssen, um dem Anliegen dienlich zu sein, belastbare Aussagen über den Krankheitsverlauf treffen und Therapiewirksamkeit vorhersagen zu können.

Um die Basis, diesem Anliegen gerecht zu werden, weiter auszubauen, sollen im Folgenden zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen in den Fokus gerichtet werden.

1.2 Metastasierung und Minimal Residual Disease

Im peripheren Blut oder in der Lymphe zirkulierende Tumorzellen werden zusammen mit im Knochenmark disseminierten Tumorzellen und therapieresistenten Krebszellen unter dem Terminus der Minimalen Resterkrankung oder auch *Minimal Residual Disease* gefasst [1]. Hiervon ist die Metastasierung einer Malignomerkrankung abzugrenzen, die allerdings aus einer Minimal Residual Disease hervorgehen kann.

Ausgehend vom Primarius der Erkrankung werden verschiedenste Signalwege beeinflusst, um Wachstum und Migration des Tumors zu ermöglichen [138, 139]. Für die Entstehung einer Metastase muss eine Tumoraussaat in das Blut- oder Lymphgefäßsystem eintreten, dabei Basalmembranen durchbrechen, der Immunabwehr beziehungsweise Apoptose widerstehen und letztlich eine erneute, dauerhafte Festsetzung am Ort der Metastasierung verrichten [1, 138, 140].

Zirkulierende Tumorzellen können dabei als die Zellen gesehen werden, die sich in Transit befinden und neben dem Primarius auch ihren Ursprung aus klinisch unauffälligen Mikro- wie bekannten Makrometastasen nehmen können [1]. Ein Krankenhausbericht des Melbourne Hospital des Jahres 1869 beschreibt erstmals den Fall, dass dem Primarius ähnliche Tumorzellen im Blut entdeckt wurden [141]. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts beobachtet Paget in der Zusammenschau von über 900 Autopsien, dass gehäuft Leber und Knochen im Zuge einer Krebserkrankung der Brust von Metastasierung betroffen sind und formuliert dabei in Bezug auf Ernst Fuchs die Seed-and-Soil-Theorie, die besagt, dass in Zirkulation befindliche Tumorzellen einen günstigen Nährboden finden müssen, um sich nach Verteilung über die Blutbahnen an einer Stelle im Körper absiedeln und eine Metastase ausbilden zu können [142]. Diese Hypothese findet heute breite Unterstützung und in zirkulierenden Tumorzellen wird der Samen gesehen, der zur Aussaat führen kann, indem er eine Tumordissemination bewirkt [1, 143, 144]. Experimentelle Untersuchungen haben darüberhinaus gezeigt, dass disseminierte Tumorzellen die Fähigkeit haben, zu ihrem Entstehungsort zurückkehren und das Wachstum und den Bestand ihres Primarius unterhalten zu können, was mit einem erhöhten Risiko für ein lokales Rezidiv verbunden ist [145, 146]. Diesem Konstrukt des *Self-Seedings* des Tumors wird die Wirkung einer gesteigerten Wachstumsrate des Ursprungstumors, der Förderung lokaler Rezidive sowie natürlicher Selektion aggressiverer zirkulierender Tumorzellen, deren Fähigkeit zur Ausbildung von Fernmetastasen erhöht ist, zugeschrieben [1, 143, 147, 148]. Zudem zeigen Untersuchungen auf, dass Brustkrebszellen resistent auf Chemo- und Strahlentherapien reagieren können und auch aus therapeutisch vorbehandelten Krebszellen eine Tumorinduktion hervorgehen kann, womit illustriert wird, dass in einem Organismus therapierefraktäre und in selektierter Weise zur Tumorprogression befähigte Zellen im Sinne einer Resterkrankung verbleiben und dabei sowohl zu einem lokalen Rezidiv als auch zu einer Fernmetastasierung führen können [1, 149-152].

1.2.1 Epithelial-mesenchymale Transition

Die epithelial-mesenchymale Transition ist ein inzwischen viel beschriebener Prozess, der besonders bei Karzinomen der Brust von hoher Relevanz ist, da mehr als 95% der Mammatumoren epithelialen Ursprungs sind [153, 154]. Zellen, die diese Entwicklung durchlaufen, verlieren dabei ihre epithelialen Eigenschaften und nehmen die des mesenchymalen Gewebes an. Aus Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene, was einen Verlust der Zell-Zell-Adhäsion und der Polarität sowie eine Reorganisation des Zytoskeletts mit sich bringt, resultiert ein erhöhtes Potential der Migration und Invasion [153, 155]. Neben erhöhter Resistenz gegenüber Apoptose vermögen die Zellen so, den Primarius zu verlassen, in die Blutbahn einzudringen, zu migrieren und schließlich Fernmetastasen an anderer Stelle über eine revers ablaufende mesenchymal-epitheliale Transition auszubilden [1,

153, 155-157]. Abbildung 1 veranschaulicht den Prozess, ausgehend vom Primärtumor zur möglichen Ausbildung einer Metastase [5].

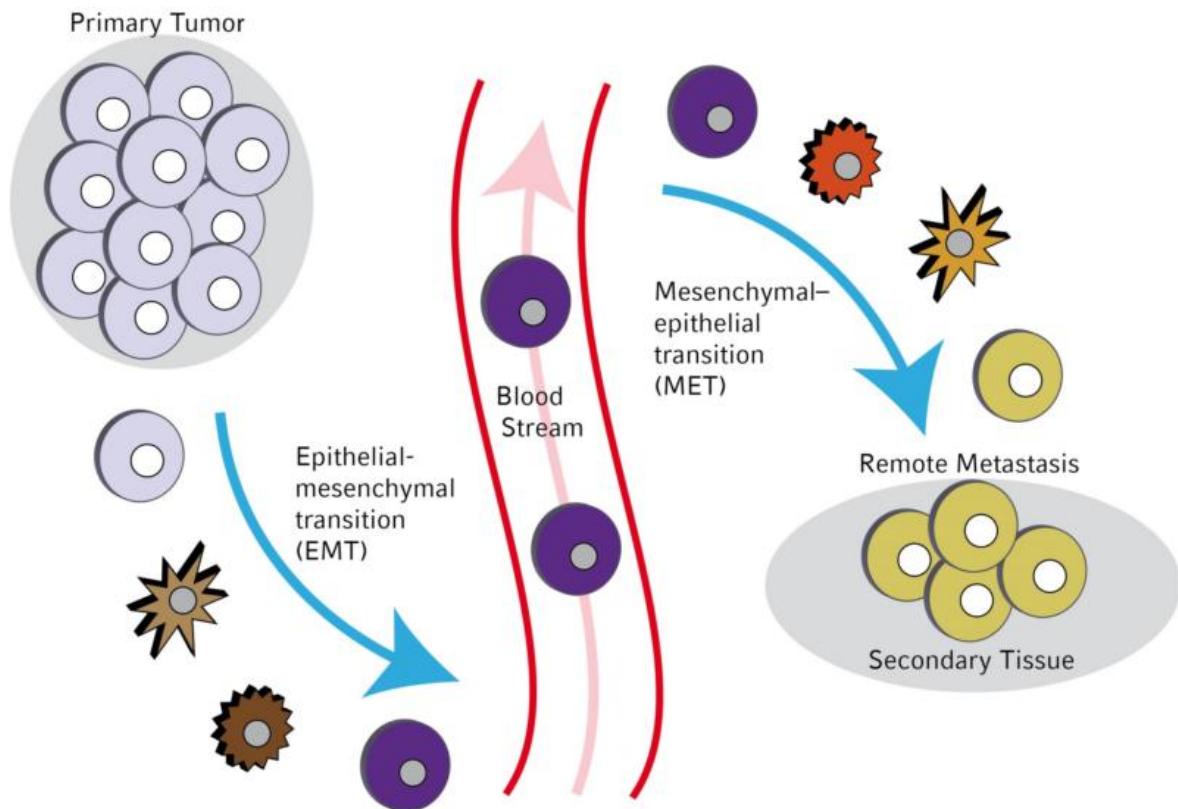


Abbildung 1: Modell der Metastasenentstehung anhand der epithelial-mesenchymalen Transition [5]

Um dies zu bewerkstelligen, ist eine Fülle von Signalwegen involviert und daher eine große Zahl von Surrogatparametern Gegenstand der Forschung, um eine abgelaufene Transition zu detektieren, was in Abbildung 2 wiedergegeben wird [1, 158]. Vimentin, Aktin, N-Cadherin, Cadherin-11 sowie Laminin, E-Cadherin und Zytokeratine sind hierbei von besonderem Interesse [155, 159].

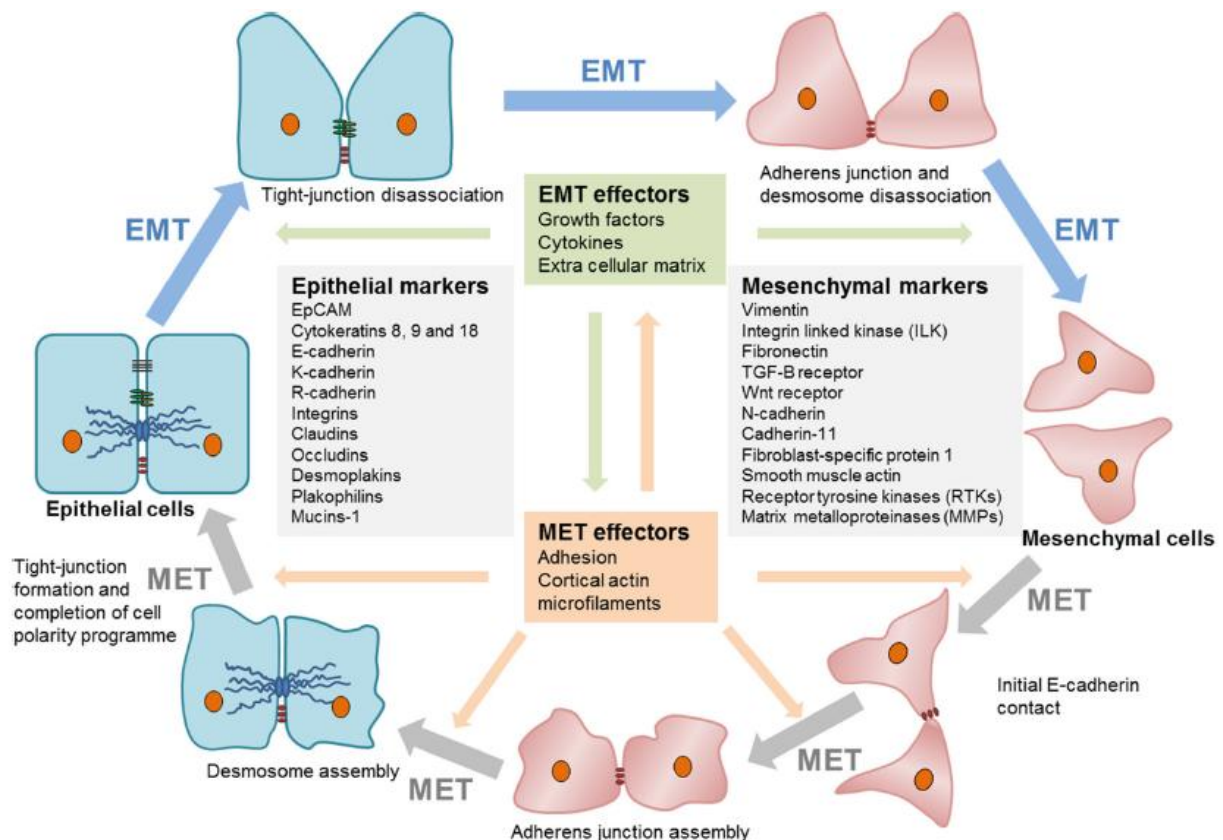


Abbildung 2: Epithelial-mesenchymale Transition und assoziierte Surrogatparameter [1]

So konnte bereits 2005 in aus Knochenmark von Brustkrebspatientinnen gewonnenen mikrometastatischen Zellen eine Veränderung in der Zusammensetzung verschiedener Zytokeratine festgestellt und ein Zusammenhang mit schlechterem Grading, erhöhtem Proliferationsindex und negativem Hormonrezeptorstatus hergestellt werden [160]. Zudem lassen sich auch bei im Blut von Brustkrebspatientinnen zirkulierenden Tumorzellen Marker nachweisen, die eine stattgehabte Transition anzeigen [161]. Zurückgehend auf Creighton et al. demonstrieren weitere Untersuchungen, dass im Blut zirkulierende Tumorzellen einen hybriden Phänotyp zwischen epithelialen und mesenchymalen Ausprägungsmustern annehmen können [1, 149, 162, 163]. Es stellt sich überdies dar, dass bei Vorliegen von disseminierten Tumorzellen, die eine epithelial-mesenchymale Transition durchlaufen haben, gehäuft mit Metastasen zu rechnen und von erhöhter Malignität auszugehen ist, weshalb der Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition Ansatzpunkt für die Entwicklung weiterer, zielgerichteter Therapien ist [153, 155, 164].

1.2.2 Tumoraussaat und biologischer Arrest des Tumors

Es hat sich gezeigt, dass karzinomatöse Streuung zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung stattfinden kann. Husemann et al. weisen bereits in niedrigen Tumorstadien epitheliale Veränderungen im Mausmodell nach, Krishnamurty et al. detektieren zirkulierende und disseminierte Tumorzellen im Blut und Knochenmark von Brustkrebspatientinnen im Frühstadium [165, 166]. Townson und Chambers formulieren bereits 2006, dass metastatische Zellen, sobald sie an einer Sekundärlokalisierung angekommen sind, proliferieren, apoptotisch zugrunde gehen oder als schlafende Zellen verharren [1, 167]. Durch diese Zellen, die Mikrometastasen ausbilden und/oder als minimale Resterkrankung überdauern können, lässt sich das Krankheitsrezidiv nach Jahren der Inapparenz auch nach erfolgreicher Ersttherapie erklären [1, 168, 169]. Untersuchungen veranschaulichen, dass gestreute Zellen in einer frühen Krankheitsphase eine geringere Zahl von Chromosomenaberrationen als der Primarius aufweisen können, was einerseits wiederum einen Hinweis auf eine Dissemination vor Diagnosestellung und Therapiebeginn gibt und andererseits in der reduzierten genetischen Dedifferenzierung ein Indiz für biologischen Arrest darstellen kann [1, 170, 171]. Die Dauer des Arrests und damit die Latenz bis zur klinischen Erscheinung der minimalen Resterkrankung als Metastase oder Rezidiv der primären Erkrankung lässt sich dabei als der Zeitraum betrachten, der für das Malignom notwendig ist, um weitere Aberrationen zu entwickeln und somit weiteres Tumorwachstum aufweisen zu können [1].

1.2.3 Nachweis zirkulierender Tumorzellen

Um den Nachweis einer minimalen Resterkrankung zu erbringen, müssen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark oder zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut detektiert werden. Da die Probengewinnung aus dem Knochenmark für die Patientinnen mit einer weit höheren Invasivität einhergeht als die Entnahme von wenigen Millilitern Blut und gerade im Hinblick auf eine Verlaufskontrolle wesentlich komfortabler durchzuführen ist, liegt großes Augenmerk auf der Untersuchung zirkulierender Tumorzellen [172]. Für die Detektion dieser stehen Immunfluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie und PCR-basierte Methoden zur Verfügung [173]. Erstere ermöglicht vornehmlich morphologische Aussagen, Zweitere quantitative und Dritte Aussagen über Genexpressionsmuster [173]. Dadurch, dass im Verhältnis auf eine zirkulierende Tumorzelle mehr als eine Million mononukleärer Zellen kommen, bedarf es sensitiver Verfahren und gegebenenfalls der Zellanreicherung [173-176]. Hierfür bieten sich beispielsweise Dichtegradientenzentrifugation, Filtration, Immunabsorption sowie die immunomagnetische oder elektrophoretische Separation an [173]. Etabliertes Nachweisverfahren für zirkulierende Tumorzellen ist heute CellSearch®, das eine Zulassung der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) in der metastasierten Situation einer Brustkrebserkrankung besitzt, wobei weitere Untersuchungen an

epithelialen Zelladhäsionsmarkern (EpCAM) wichtiger Gegenstand der gegenwärtigen Forschung sind [173, 177, 178].

1.2.4 Aussagekraft zirkulierender Tumorzellen

Schindlbeck et al. und Hartkopf et al. konnten für disseminierte Tumorzellen veranschaulichen, dass diese unabhängige prognostische Faktoren sind und auch das Risiko eines lokalen Rezidivs widerspiegeln können [173, 179, 180]. Ebenso lassen sich Aussagen aus dem Auftreten zirkulierender Tumorzellen ableiten [173]. Cristofanilli et al. zeigen bereits im Jahr 2004, dass Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs und mindestens fünf zirkulierenden Tumorzellen in 7,5 Millilitern Blut eine signifikant schlechtere Prognose haben als Patientinnen mit weniger als fünf dieser Zellen [181]. Weitere Studien belegen, dass bei Vorhandensein von zirkulierenden Tumorzellen das progressionsfreie wie das Gesamtüberleben beeinträchtigt sind und ein erhöhtes Risiko für Rezidiv und Mortalität gegeben ist [173, 182, 183]. Im Rahmen der SUCCESS-Studie, in die annähernd 1500 Patientinnen eingeschlossen wurden, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass prognostische Aussagen hinsichtlich reduzierten krankheitsfreien, metastasenfreien und Gesamtüberlebens bei Vorhandensein von mehr als einer zirkulierenden Tumorzelle vor oder nach durchgeführter Chemotherapie gewonnen werden können [173, 184]. Aufgrund dieser prognostischen Aussagekraft stellen zirkulierende Tumorzellen eine Therapieentscheidungshilfe dar, da sie einen Hinweis darauf geben, welche Patientinnen sich einem erhöhten Risiko eines schlechteren Krankheitsverlaufes gegenübersehen. Auf diese Weise gelingt es, die minimale Resterkrankung in die Risikostratifizierung miteinzubeziehen und nicht nur biologische Charakteristika des Primarius zu erfassen und zu bewerten [173].

Ein weiterer Zugewinn in der Behandlung des Mammakarzinoms, der von zirkulierenden Tumorzellen ausgeht, ist die Möglichkeit des therapeutischen Monitorings und der Erhalt prädiktiver Informationen [178]. Studien zeigen für die metastasierte Situation eine Korrelation zwischen der Effektivität der Chemotherapie und der Anzahl zirkulierender Tumorzellen [185-187]. Ebenfalls ist eine Korrelation mit der bildgebenden Diagnostik nachgewiesen und es mag sein, dass die Detektion zirkulierender Tumorzellen eine frühere Aussage über eine etwaige Krankheitsprogression erlaubt als die klassische Bildgebung [188, 189].

Schließlich sind Kenntnisse über die Charakteristika der zirkulierenden Tumorzellen selbst von eminenter Bedeutung, da von diesen im Rahmen der minimalen Resterkrankung Malignität ausgehen kann und sie dadurch selbst zum therapeutischen Ziel und somit Ansatz für die Entwicklung spezifisch wirksamer Behandlungen werden [178].

1.3 Experimenteller Ansatz dieser Forschungsarbeit

Für die Detektion zirkulierender Tumorzellen wird in der vorliegenden Arbeit die quantitative Real Time-Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Bereits im Jahre 1994 wurde diese Methode in ihrem Einsatz zur Detektion okkulten Tumoren der Mamma beschrieben, nachdem die Polymerase-Kettenreaktion in den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts von Kary Mullis entwickelt worden ist [4, 190-192]. Bis zum Ende des zweiten Jahrtausends zeigten weitere Veröffentlichungen, dass die Polymerase-Kettenreaktion ein wirkungsvolles Instrument darstellt, eine minimale Resterkrankung bei Brustkrebspatientinnen aufzudecken [193-195]. Auch im 21. Jahrhundert sind die verschiedenen Methoden der Nachweismöglichkeit von Tumorresiduen der weiblichen Brust ein bedeutender Forschungsschwerpunkt. Gerade in Kombination mit Zellanreicherungsverfahren zeigt sich unter anderem in vergleichenden Studien gegenwärtig angewendeter Detektionsmethoden, dass die Polymerase-Kettenreaktion eine sehr hohe Sensibilität mit sich bringt [196-199]. Der besondere Wert und die Herausforderungen dieser Methode für die Zukunft werden in einer von Andergassen et al. im Jahr 2016 veröffentlichten Übersichtsarbeit beleuchtet [200].

1.3.1 Quantitative Real Time-Polymerase-Kettenreaktion

Das Wesen der Polymerase-Kettenreaktion ist die Vervielfältigung von DNA, wobei der Real Time-Ansatz die Unterscheidung und quantitative Messung spezifischer Nukleinsäuren mit der Hilfe von Fluoreszenzsignalen ermöglicht [4, 201, 202]. Elementare Schritte der Kettenreaktion sind Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Hybridisierung der Primer und Elongation des neuen Doppelstrangs, wobei jeweils unterschiedliche Temperaturbereiche durchlaufen werden müssen [3, 4].

Wie in Abbildung 3 illustriert wird, liegen nach Erhitzen des Doppelstrangs als Ergebnis des Denaturierungsschrittes zwei Einzelstränge vor. Der zweite Schritt findet auf einem Temperaturlevel statt, das die Anlagerung spezifischer Primer an die nun vorliegenden Einzelstränge ermöglicht. Im letzten Schritt geht die Elongation vonstatten, wobei eine DNA-Polymerase die Synthese neuer Doppelstränge bewirkt [3]. So führt jeder Zyklus der Kettenreaktion zu einer Verdopplung des Ausgangsmaterials.

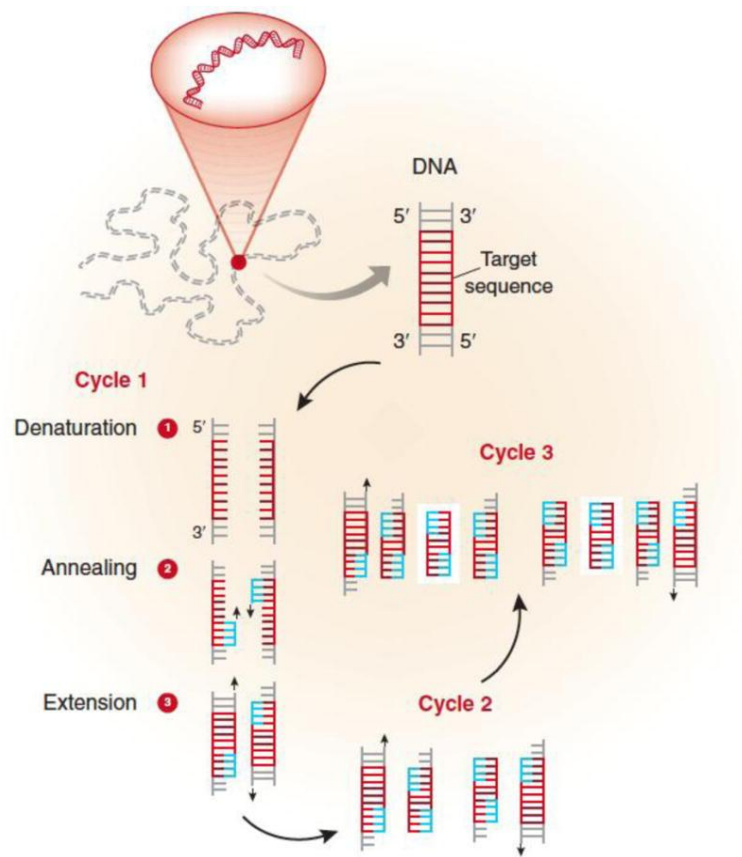


Abbildung 3: Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion [3]

Um diese Reaktion stattfinden zu lassen, müssen Ausgangs-DNA, genspezifische Primer, Nukleotide und eine DNA-Polymerase vorliegen [3]. Für eine quantitative Analyse bedarf es zudem der Anwendung eines Fluoreszenzfarbstoff-Verfahrens [4]. Gängige Verwendung findet hierbei der Ansatz mit aus *Thermus aquaticus* gewonnener hitzestabiler Taq-DNA-Polymerase, deren zusätzliche 5'-3'-Exonukleaseaktivität man sich zunutze macht [4, 203, 204]. Das Fluoreszenzverfahren mittels einer TaqMan-Sonde, die ein Reporter- und ein Quencher-molekül trägt, bedient sich dabei des Resonanzenergietransfers nach Theodor Förster [2, 204, 205]. Abbildung 4 zeigt, dass solange die beiden Moleküle eng zueinander gebunden sind, eine Signalunterdrückung stattfindet. Werden sie im Laufe der Amplifikation, während die Taq-DNA-Polymerase den Einzelstrang zum Doppelstrang synthetisiert, durch die Exonuklease-Funktion getrennt, kann das Fluoreszenzsignal des Reporters detektiert werden [4, 204]. Auf diese Weise gelingt die Aufzeichnung des Voranschreitens der Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit.

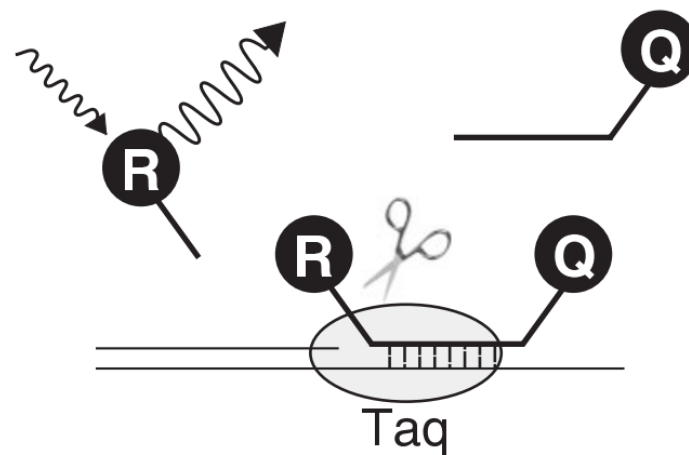


Abbildung 4: Wirkprinzip der TaqMan-Sonde mit Reporter- und Quencher-Molekül [4]

Um RNA zu amplifizieren, muss eine reverse Transkription zur Generierung von komplementärer DNA vorgeschaltet werden [4]. Diese cDNA dient als Ausgangsmaterial der anschließenden Kettenreaktion, was somit auch die Betrachtung von Genexpressionen der RNA-Ebene erlaubt [4, 206].

Für die Auswertung der Methode stehen absolute und relative Quantifizierung zur Verfügung, wobei Letztere weit häufiger Verwendung findet [2]. Hierfür wird sich bevorzugt der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode nach Livak und Schmittgen bedient [207]. Um diese anwenden zu können, wird für die Normalisierung eine interne Kontrolle benötigt [207]. Die Anforderungen, die an diese gestellt werden, um als solche fungieren zu können, sind ubiquitäres Vorkommen und von äußeren Faktoren unbeeinflusstes Genexpressionsverhalten, was beispielsweise bei Haushaltsgenen vorliegt [4, 207, 208]. Unter anderem GAPDH und die ribosomale Untereinheit 18s stellen zu diesem Zweck geeignete Referenzgene dar [207-211].

Der entscheidende Vorteil der Real Time-Messung ist, dass die Erfassung der Amplifikation während der exponentiellen Phase der Kettenreaktion erfolgen kann und somit eine Effizienz von nahezu 100% vorliegt [2, 212].

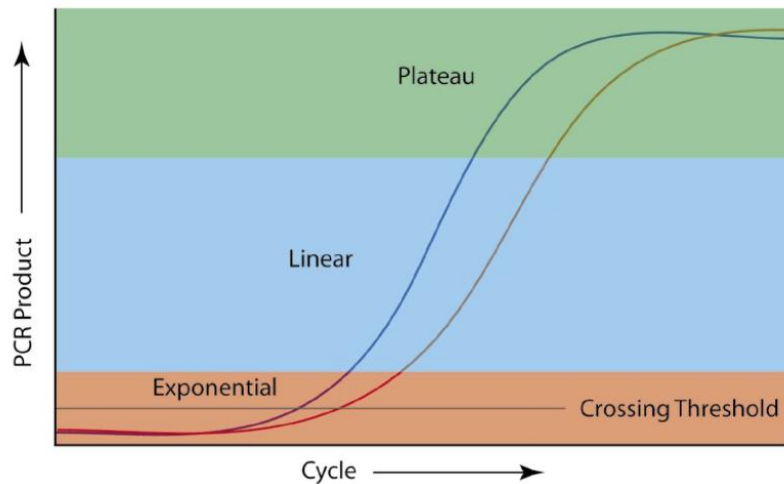


Abbildung 5: Phasen der Polymerase-Kettenreaktion und Schwellenwertermittlung [2]

Die Anzahl der Zyklen der Kettenreaktion, zu der das detektierte Fluoreszenzsignal einen gewissen Schwellenwert der Hintergrundfluoreszenz überschreitet, gibt der Ct-Wert wieder [212]. Es liegt ein indirekt proportionales Verhältnis zwischen Genexpression und Zyklusanzahl vor, sodass hohe Ct-Werte für eine geringe Genexpression sprechen, wohingegen ein niedriger Ct-Wert eine hohe Genexpression anzeigt [2, 4, 212]. Der Ct-Wert des zu untersuchenden Genmaterials wird gegen den Ct-Wert der Referenz normalisiert und als ΔCt -Wert notiert, um nach Subtraktion mit dem ΔCt -Wert der Kontrolle als $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert gefasst zu werden [2, 207]. Den Wert der relativen Quantifizierung – RQ-Wert genannt – erhält man nach der Formel von Livak und Schmittgen, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ [207].

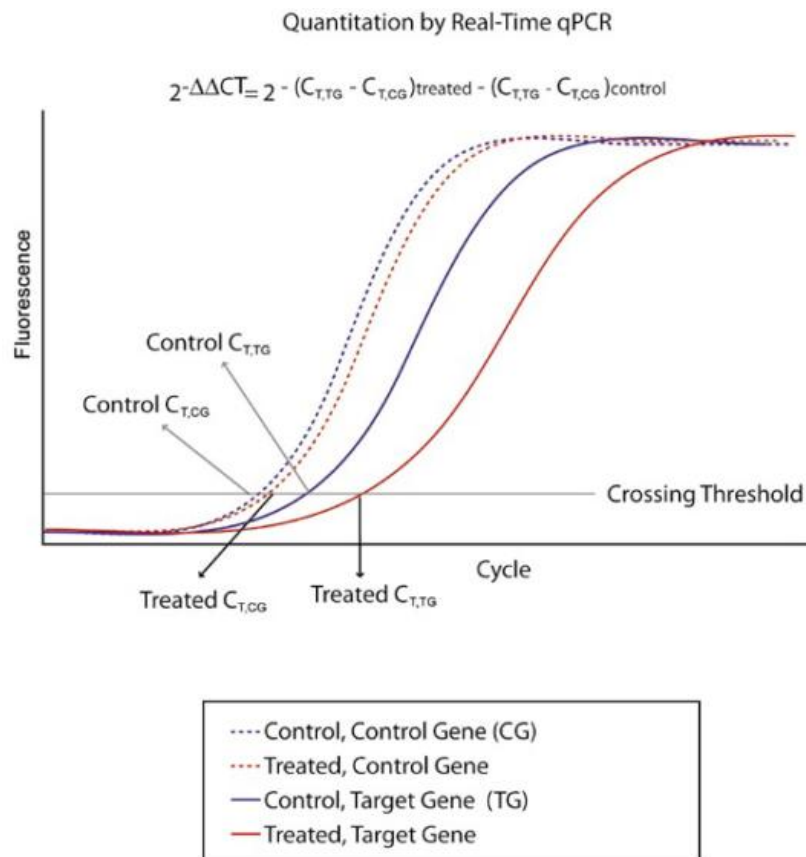


Abbildung 6: Mathematische Grundlage der Berechnung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode [2]

Hieraus lässt sich nun bei Einsetzen der Ct-Werte in die Formel ermitteln, dass bei einem RQ-Wert <1 eine geringere Genexpression des untersuchten Gens im Vergleich zur Kontrolle vorliegt und bei RQ-Werten >1 , dass vergleichend eine erhöhte Genexpressionsrate festzustellen ist [2, 207].

1.3.2 Markergene der Real Time-Polymerase-Kettenreaktion

Um Markergene zu identifizieren, die Aussagen bezüglich der Charakteristik zirkulierender Tumorzellen erlauben, erfolgt die Betrachtung der gegenwärtigen Literatur. Für die Auswahl potentieller Marker stellen vor allem zum einen in der Routinediagnostik abgefragte Biomarker, zum anderen von vielversprechenden Genexpressionstests an Tumormaterial verwendete Parameter einen interessanten Forschungsansatz dar. Der Multi-Gene Assay Oncotype DX®, der an Paraffinschnitten des Tumors durchgeführt wird, beinhaltet dabei den Proliferationsmarker Ki-67 und den Invasionsmarker Cathepsin L2, untersucht den Her2- sowie Hormonrezeptorstatus und schließt Bcl2 als antiapoptotisches Protein ein [213-215]. Studien zeigen für dieses Protein Relevanz für eine prognostische Risikostratifizierung, gerade in der metastasierten Situation oder bei Vorliegen eines triple-negativen Karzinoms [215-217]. Bezüglich der Cystein-Protease Cathepsin L2 ist die Studienlage weniger stark ausgeprägt beleuchtet, es zeigt sich jedoch, dass sie bei Brustkrebs – wie auch beim

Pankreaskarzinom – und in der Zellkultur zu detektieren ist und dabei zu Tumorprogression und Dissemination beitragen kann, was sie zu einem potentiell vielversprechenden charakteristischen Marker zirkulierender Tumorzellen macht [218-225]. Von Informationen hinsichtlich des Her2- wie des Hormonrezeptorstatus geht überdies eine erhebliche klinische Bedeutung aus, da diese in der Erfassung der Merkmale des Primärtumors zum einen valide prognostische und prädiktive Aussagen zulassen, zum anderen die Ausrichtung der Therapie maßgeblich beeinflussen [68]. Die Erhebung dieser Charakteristika anhand zirkulierender Tumorzellen kann daher ebenfalls einen Beitrag leisten, als Parameter in der Auswahl von Behandlungsoptionen zu fungieren sowie Auskunft über Prädiktion und Prognose zu geben.

1.4 Zielsetzung des experimentellen Ansatzes

Um die Eignung potentieller Marker im Blut zirkulierender Tumorzellen zu ermitteln, sollen diese zunächst in einem Modellsystem, bestehend aus Blut gesunder Spenderinnen und einer Konzentrationsreihe zellkulturell gewonnener Krebszellen, evaluiert werden. Schließlich sollen positiv evaluierte Marker an Blutproben adjuvanter Brustkrebspatientinnen gegenüber gesunder Kontrollproben untersucht werden.

Die Polymerase-Kettenreaktion, die mit dem Versprechen hoher Sensitivität und Spezifität aufwartet, wird als derzeit mehr und mehr in die klinische Routinediagnostik vordringende Methode als Mittel der Wahl angewandt.

Auf diese Weise versucht diese Arbeit weitere Erkenntnisse im Blick auf die Charakterisierung im Blut zirkulierender Tumorzellen zu gewinnen, um beizutragen, prädiktive wie prognostische Aussagen formulieren, Therapie- und Verlaufsmonitoring vornehmen sowie letztlich Patientinnen eine individualisierte Therapie anbieten zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Spezifizierung	Hersteller
Gefrierschrank -20°C	Bosch Cooler	Robert Bosch GmbH Gerlingen, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Hera Freeze	Thermo Electron Corporation Waltham, Massachusetts, USA
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Inkubator	ThermoScientific HeraCell 150i CO2 Incubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Mikroskop	Carl Zeiss Mikroskop	Carl Zeiss AG Oberkochen, Deutschland
Minizentrifuge	Centrifuge 5415	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Photometer	Nanodrop	Implen München, Deutschland
Pipetten	Finnpipette F2, 1-10µl, 10-100µl, 100-1.000µl Volumen	Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA
Pipettierhilfe	Accu-jet pro	Brand GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Real Time-PCR-Gerät	7500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems Carlsbad, California, USA
Sicherheitswerkbank	HeraSafe Heraeus Instruments	Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA
Tischzentrifuge	Multifuge 3SR+/3L-R	Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA
Zählkammer	Neubauer Improved, 0,100mm Tiefe, 0,0025mm ²	LO - Laboroptik Lancing, Vereinigtes Königreich

Tabelle 5: Verwendete Geräte und Hilfsmittel

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Spezifizierung	Hersteller
EDTA-Blutentnahmeröhrchen	BD Vacutainer® EDTA Röhrchen K ₂ EDTA (1,8mg/ml) (16x100mm)	Becton, Dickinson and Company Franklin Lakes, New Jersey, USA
Einmalhalter (Blister)	BD Vacutainer® Holders	Becton, Dickinson and Company Franklin Lakes, New Jersey, USA
Eppendorf-Tube	Multi Safe Seal Tubes farblos 1,5/1,7ml	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Falcon-Röhrchen	CELLSTAR® TUBES, PP, graduated conical bottom, blue screw cap, sterile	Greiner Bio-One AG Kremsmünster, Österreich
Flügelkanüle	BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set (0,8x19x305mm)	Becton, Dickinson and Company Franklin Lakes, New Jersey, USA
Glaspipette	einzel steril, 5ml, 10ml	Sarstedt AG & Co. Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze	-10µl, -100µl, -1000µl Volumen	Biozym Scientific GmbH Hessisch Oldendorf, Deutschland
PCR-Abdeckfolie	MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems Carlsbad, California, USA
PCR-Platte	MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0,1 mL	Applied Biosystems Carlsbad, California, USA
Zellkulturflasche	Zellkulturflasche mit Filter- Schraubkappe 75cm ²	TPP AG Trasadingen, Schweiz

Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Bezeichnung / Zusammensetzung	Hersteller
Aqua ad iniectabilia	Wasser für Injektionszwecke	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Chloroform	EMSURE® ACS, ISO, Reag. PhEurChloroform for analysis	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
DEPC-behandeltes Wasser	0,1 % Diethyl-Pyrokarbonat (DEPC)	Invitrogen Carlsbad, Kalifornien, USA
Ethanol	Ethanol absolutforanalysis	Mallinckrodt Baker B.V. Deventer, Niederlande
Fetales Kälberserum	FETAL BOVINE SERUM	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Histopaque	HISTOPAQUE®-1077 sterile-filtered, density: 1.077 g/ml	Sigma-Aldrich Corporation St. Louis, Missouri, USA
Isopropanol	EMSURE® ACS, ISO, Reag. PhEur2-Propanol for analysis	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Nährmedium	Dulbecco's MEM w 3,7g/L NaHCO ₃ w 4,5 g/L D-Glucose w stable glutamine w Na-Pyruvate low endotoxin	Biochrom AG Berlin, Deutschland
PBS-Lösung	Phosphat Buffered Saline Dulbecco w/o Ca ²⁺ w/o Mg ²⁺	Biochrom AG Berlin, Deutschland
PCR-Mastermix	TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x) 250 reactions	Applied Biosystems Carlsbad, California, USA
Penicillin / Streptomycin	10.000 U/ml / 10.000 µg/ml, lyophilized	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Trizol-Lösung	TRIzol® Reagent	Life Technologies Carlsbad, California, USA
Trypanblau-Lösung (0,4%)	in 0,81% sodium chloride and 0.06% potassium phosphate, dibasic	Sigma-Aldrich Corporation St. Louis, Missouri, USA
Trypsin / EDTA-Lösung	0,05% / 0,02% (w/v) in PBS w/o Ca ⁺⁺ w/o Mg ⁺⁺	Biochrom AG Darmstadt, Deutschland
Umschreibungs-enzymmix	Super Script® III First Strand Synthesis Super Mix 50rxn RNase OUT™ Mix	Invitrogen Carlsbad, California, USA
Umschreibungs-primer	Super Script® III First Strand Synthesis Super Mix 50rxn Oligo (dT) ₂₀ 50µM	Invitrogen Carlsbad, California, USA
Umschreibungs-puffer	Super Script® III First Strand Synthesis Super Mix 50rxn Annealing Buffer	Invitrogen Carlsbad, California, USA
Umschreibungs-reaktionsmix	Super Script® III First Strand Synthesis Super Mix 50rxn	Invitrogen Carlsbad, California, USA

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

2.1.4 Zelllinie

Zelllinie	Bezeichnung	Hersteller
CAMA-1	ATCC: HTB-21 mammary gland / breast adenocarcinoma	ATCC Wesel, Deutschland

Tabelle 8: Verwendete Brustkrebszelllinie

2.1.5 Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion-TaqMan-Primer

TaqMan-Primer	Bezeichnung	Hersteller
18s	Hs03003631_g1	Applied Biosystems Carlsbad, California, USA
GAPDH	Hs99999905_m1	Applied Biosystems Carlsbad, California, USA
Bcl2	Hs01048932_g1	Applied Biosystems Carlsbad, California, USA
Cathepsin L2	Hs00952036_m1	Applied Biosystems Carlsbad, California, USA
Her2	Hs00170433_m1	Applied Biosystems Carlsbad, California, USA
Ki-67	Hs01032443_m1	Applied Biosystems Carlsbad, California, USA
Östrogenrezeptor	Hs00174860_m1	Applied Biosystems Carlsbad, California, USA
Progesteronrezeptor	Hs01556702_m1	Applied Biosystems Carlsbad, California, USA

Tabelle 9: Verwendete TaqMan-Primer der Real Time-Polymerase-Kettenreaktion

2.2 Methoden

Für die Erstellung eines Modellsystems muss in Blutproben gesunder Spenderinnen die relevante Zellfraktion durch Zentrifugationsschritte angereichert, die RNA nach Zugabe einer vordefinierten Anzahl an Tumorzellen extrahiert sowie komplementäre DNA generiert werden, um die potentiellen Gene so im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion evaluieren zu können. Anschließend können positiv evaluierte Marker an Blut von Brustkrebspatientinnen bei Anwendung des gleichen Aufbereitungsprozesses ohne Zugabe von Tumorzellen aus der Zellkultur mit der Polymerase-Kettenreaktion untersucht werden.

2.2.1 Zellkulturtechnik, Zellzahlbestimmung und Spiking

Für die Erstellung des Modellsystems zur Untersuchung möglicher Markergene bedarf es der Verwendung von Tumorzellen aus einer Brustkrebszelllinie.

Material:

- Brustkrebszelllinie CAMA-1
- PBS
- Trypsin / EDTA
- DME-Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin / Streptomycin
- Trypanblau
- Kulturflasche
- 50ml Falcon-Röhrchen
- Glaspipetten
- Pipettierhilfe
- Pipettenspitzen
- Pipetten
- Inkubator
- Zählkammer und Objektträger
- Mikroskop
- Sicherheitswerkbank

Methode:

Die Arbeiten werden an der Sicherheitswerkbank mit entsprechend sterilen Bedingungen durchgeführt, wobei die Brustkrebszelllinie CAMA-1 verwendet wird. Diese Zelllinie wurde im Jahr 1975 von Jørgen Fogh etabliert, wobei die Zellen aus dem malignen Pleuraerguss einer 51-jährigen, kaukasischen Patientin mit metastasiertem Adenokarzinom der Brust isoliert worden sind [226, 227].

Der Überstand des Mediums wird zunächst abgeschüttet und sodann die Kulturflasche mehrmals mit PBS gespült, sodass möglichst wenig Rückstände des Mediums überbleiben. Nach Zugabe von 3ml Trypsin / EDTA, um die Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche sowie untereinander zu lösen, und erneuter Inkubation bei 37°C und 5% CO₂-Partialdruck erfolgt die Entnahme einer Zellsuspension [228]. Hierfür wird Medium zugegeben, um zunächst das Trypsin zu inaktivieren und im Weiteren die Suspension zu entnehmen. Diese wird verworfen oder für weitere Experimente verwendet. Die Kulturflasche, in der nur ein geringer Anteil der Ausgangskultur verblieben ist, wird anschließend mit Medium, das 10% Fetales Kälberserum und 1% Penicillin / Streptomycin enthält, aufgefüllt und als erneuerte Kultur inkubiert. Dieser Vorgang der Subkultivierung erfolgt zweimal wöchentlich, um eine ausreichende Proliferationsrate gewährleisten und einer zu hohen Zelldichte und somit dem Absterben der angelegten Kultur vorbeugen zu können [228].

Mittels einer Neubauer-Zählkammer werden die Zellen gezählt. Pro Well wird ein Ansatz von 50µl PBS, 25µl Trypanblau und 25µl Zellsuspension erstellt und die Kammer unter dem Mikroskop ausgezählt.

In der aufsteigenden Reihe von 0, 10, 100 und 1.000 Zellen pro Milliliter Blut werden diese bei der Generierung des Modellsystems dem Blut von gesunden Spenderinnen bei der Probenaufbereitung im Anschluss an die Zugabe von Trizol im Rahmen der RNA-Extraktion zugegeben.

2.2.2 Blutprobenaufbereitung

Sowohl für die Durchführung des Modells als auch die Untersuchung der Genexpression zirkulierender Tumorzellen von Mammakarzinompatientinnen erfolgt die Aufarbeitung von Blutproben. Für beide Kollektive wird auf gleiche Weise vorgegangen; mit der Ausnahme der Zugabe von Tumorzellen für die Erstellung des Modellsystems. Für die Sammlung und Verwendung des Bluts adjuvanter Brustkrebspatientinnen der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Klinikums der Universität München liegt das Einverständnis der Patientinnen und das Ethikvotum der Kennung LMU 148-12 vor.

Material:

- EDTA-Röhrchen
- 20ml peripher entnommenes Blut weiblicher Probandinnen
- Flügelkanüle, Stauschlauch, Desinfektionsmittel, Tupfer
- PBS
- 50ml Falcon-Röhrchen
- Histopaque

- Zentrifuge
- Glaspipetten
- Pipettierhilfe
- Gefrierschrank

Methode:

In einem ersten Arbeitsschritt wird hierbei ein Gemisch, das sich aus 20ml EDTA-Vollblut und 10ml PBS zusammensetzt, auf 20ml Histopaque geschichtet. Die Schichtung wird bei Raumtemperatur mit 400g 30 Minuten zentrifugiert (ohne Bremse). Die zellhaltige Interphase des zentrifugierten Röhrchens wird in einen neuen Falcon-Behälter übertragen und mit PBS auf 50ml aufgefüllt, wobei sich ein weiterer Zentrifugierungsschritt bei 250g (mit Bremse) über 10 Minuten bei 4°C anschließt. Hiernach erfolgt die Dekantierung des Röhrcheninhalts und nach Abtropfen Lagerung des Röhrchens mit am Boden befindlichen Zellpellet bei -80°C.

2.2.3 RNA-Gewinnung

Um RNA zu isolieren, bedient man sich eines Trizol-Chloroform-Extraktionschrittes. Durch Abtrennung der Zellbestandteile wird RNA erhalten, deren Konzentration photometrisch gemessen wird, um im nächsten Arbeitsschritt in komplementäre DNA umgeschrieben werden zu können. Für das Modellsystem wird nach der Zugabe von Trizol eine definierte Anzahl aus CAMA-1-Zellkultur gewonnener Tumorzellen hinzugefügt.

Material:

- Zellpellet
- Trizol
- CAMA-1-Brustkrebszellen
- Chloroform
- Isopropanol
- 75% Ethanol
- DEPC-behandeltes Wasser
- Aqua ad iniectabilia
- Eppendorf-Tubes
- Pipettenspitzen
- Pipetten
- Trockentücher
- Zentrifuge

- Photometer
- Gefrierschrank

Methode:

Zur Extraktion der RNA wird das Pellet in 1ml Trizol resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Für die Erstellung des Modellsystems werden nun in der Konzentrationsreihe von 0, 10, 100 beziehungsweise 1.000 Tumorzellen der CAMA-1-Zellkultur den aus Blut gesunder Spenderinnen gewonnenen Pellets beigefügt. Unter sorgfältiger Beachtung von Vortex-Durchgängen werden nun 200µl Chloroform hinzugegeben, um schließlich bei 12.000g (ohne Bremse) 15 Minuten bei 4°C zu zentrifugieren. Die obere, wässrige Phase des Eppendorf-Gefäßes wird nachfolgend in ein Tube, in das 500µl gekühltes Isopropanol vorgelegt wurde, überführt. Die Lagerung einer derartigen Probe findet anschließend bei -20°C statt.

In einem weiteren Arbeitsschritt wird nach mehrstündiger Lagerung des gewonnenen Probenmaterials erneut mit 12.000g (ohne Bremse) bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wird dem RNA-Pellet 1ml gekühlter, 75%-iger Alkohol hinzugefügt und anschließend für weitere zehn Minuten zentrifugiert. Wiederum wird flüssiger Überstand abgenommen und gegebenenfalls letzte Alkoholreste nach einem erneuten Zentrifugierungsschritt bei 13.000 rpm mit der Pipette entfernt. Nach kurzer Trocknungspause wird das Pellet mit 20µl RNase-freiem Wasser durchmischt, wonach wiederum eine Lagerung bei -20°C möglich ist.

Für die Messung der Konzentration der RNA wird das Photometer mit Dilution Factor 1000, aktiviertem Background und Factor 40,0 verwendet. Die Einheit µg / µl wird zur Ausgabe der Messergebnisse gewählt. Vor Beginn der Messung findet eine Kalibrierung mit 4µl Aqua ad iniectabilia statt. Zwischen eines jeden Messvorgangs wird die Messzelle mit 70%-igem Alkohol, Aqua a. i. und trockenem Tuch gereinigt. Vor Messung mit 4µl der Probe wird diese sorgfältig gevortext. Die Konzentration der Probe ergibt sich aus der optischen Dichte der Probe bei einer Wellenlänge von 260nm. Die Ratio als Qualitätskontrolle wird aus dem Quotient der optischen Dichte der Probe bei 260nm und 280nm gebildet. Rückstände der Probe auf der Messzelle werden in das Eppendorf-Gefäß rücküberführt, um eine möglichst probenerhaltene Arbeitsweise zu gewährleisten. Die weitere Lagerung benötigt abermals eine Temperatur von -20°C.

2.2.4 Reverse Transkription

Für die Umschreibung der RNA in komplementäre DNA, die in die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt werden kann, wird die reverse Transkription angewendet.

Material:

- gewonnene RNA
- DEPC-behandeltes Wasser
- Super Script III First Strand Synthesis Super Mix
- Pipettenspitzen
- Pipetten
- Heizblock
- Zentrifuge
- Gefrierschrank

Methode:

Um die Umschreibung in komplementäre DNA (cDNA) vorzunehmen, ist zunächst die Berechnung der benötigten Menge an RNA vonnöten. Bei einfachem Ansatz sind für eine Umschreibung 4µg RNA in einem maximalen Volumen von 6µl nötig, sodass unter Umständen bei einer zu niedrigen Konzentration der RNA eine Vakuum-Zentrifugation mit dem Ziel der Aufkonzentrierung erforderlich wird. Die gegebenenfalls mit RNase- / DNase-freiem Wasser auf 6µl ergänzte RNA, die ja 4µg RNA beinhalten muss, wird um 1µl Primer (Oligo-dTs) und 1µl Annealing-Buffer zum 8µl umfassenden Reaktionsansatz vervollständigt. Dieser Ansatz, der auch in einem mehrfachen Ansatz vorgelegt werden kann, wird schließlich bei 65°C für 5 Minuten inkubiert. Der im Folgenden auf Eis gestellten Probe wird für den einfachen Ansatz 10µl First Strand Reaction Mix und 2µl Super Script III / RNase OUT Enzyme Mix zupipettiert und dieses darauf gevortext, woraufhin eine weitere Inkubation bei 50°C über 50 Minuten erfolgt. Für die Denaturierung der Enzyme werden die Proben einem folgenden Inkubationsschritt bei 85°C über fünf Minuten unterzogen, ehe die nun vorliegende cDNA bei einer Temperatur von -20°C gelagert wird.

2.2.5 Real Time-Polymerase-Kettenreaktion

Schließlich wird die hergestellte komplementäre DNA in die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Dabei werden genspezifische TaqMan-Primer verwendet, die mit Amplifizierung des Synthesematerials eine Fluoreszenzdetektion während der exponentiellen Phase der Reaktion ermöglichen und somit Rückschluss auf das Genexpressionslevel zulassen.

Material:

- gewonnene cDNA
- TaqMan-Primer (GAPDH, 18s, Progesteron- und Östrogenrezeptor, Her2, Ki67, CatL2, Bcl2)
- TaqMan Fast Universal PCR Mastermix
- DEPC-behandeltes Wasser
- 96 Well-Real Time-PCR-Platte
- Platten-Abdeckfolie
- Pipettenspitzen
- Pipetten
- Zentrifuge
- 7500 Fast Real Time-PCR-System

Methode:

Um die Polymerase-Kettenreaktion ablaufen zu lassen, werden pro Well der Reaktionsplatte 7µl Nuklease-freies Wasser, 10µl TaqMan Fast Universal PCR Mastermix, 1µl Primer sowie 2µl cDNA eingesetzt. Neben dem Einsatz von Marker-Proben finden zwei Negativkontrollen ebenfalls auf der gleichen Platte Anwendung. Nach Pipettieren der Wells wird die Platte mit Adhesive Cover abgedeckt und kurz zentrifugiert. Für die Analyse im PCR-Gerät wird für 20 Sekunden bei 95°C und anschließend in 40 Zyklen für 3 Sekunden bei jeweils 95°C und 30 Sekunden bei 60°C inkubiert, um nach initialer Denaturierung den Amplifikationsprozess ablaufen zu lassen und Fluoreszenzsignale zu detektieren.

2.2.6 Ergebnisauswertung

Die mit dem PCR-Gerät detektierten Fluoreszenzsignale der Real Time-Polymerase-Kettenreaktion werden mit Hilfe der SDS 1.3.1-Software angezeigt. Für die Auswertung werden sodann Ct-, Δ Ct-, $\Delta\Delta$ Ct-Werte generiert und die relative Quantifizierung nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel nach Livak und Schmittgen ermittelt. Durch den Wert der relativen Quantifizierung ergibt sich die Aussage, ob ein Gen in seiner Expression relativ zur Kontrolle hochreguliert (RQ-Wert >1) oder supprimiert (RQ-Wert <1) ist. Entsprechende Grafiken zur Veranschaulichung der Ergebnisse werden mit Microsoft Excel erstellt. Statistische Auswertungen werden mit SPSS Version 22 vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung des Modellsystems

Ehe Tumormarker hinsichtlich der Charakterisierung im peripheren Blut von Brustkrebspatientinnen zirkulierender Tumorzellen verwendet werden können, bedarf es der Evaluation im Modellsystem. Die sechs potentiellen Markergene Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, Ki-67, Her2, Bcl2 und Cathepsin L2 werden deshalb auf ihre Expression unter determiniertem Einsatz von Tumorzellen im Experiment untersucht. Dem Blut gesunder Spenderinnen werden daher pro Milliliter Blut 0, 10, 100 und 1.000 Tumorzellen, die aus der Brustkrebszelllinie CAMA-1 gewonnen werden, hinzugefügt, um so eine Konzentrationsreihe anzulegen. Diese Konzentrationsreihe soll sich in der Messung der Genexpression mit der Real Time-Polymerase-Kettenreaktion widerspiegeln, um dem untersuchten Biomarker Validität zuschreiben und für eine Untersuchung der genetischen Charakteristika zirkulierender Tumorzellen heranziehen zu können.

Die ermittelten Werte der relativen Quantifizierung der potentiellen Marker in der Konzentrationsreihe sind in den folgenden Grafiken und Tabellen illustriert.

Tumorzellkonzentrationsreihe	0	10	100	1.000
RQ-Wert	1,000	0,638	2,336	12,267

Tabelle 10: Relative Quantifizierungswerte der Genexpression des Östrogenrezeptors in der Konzentrationsreihe

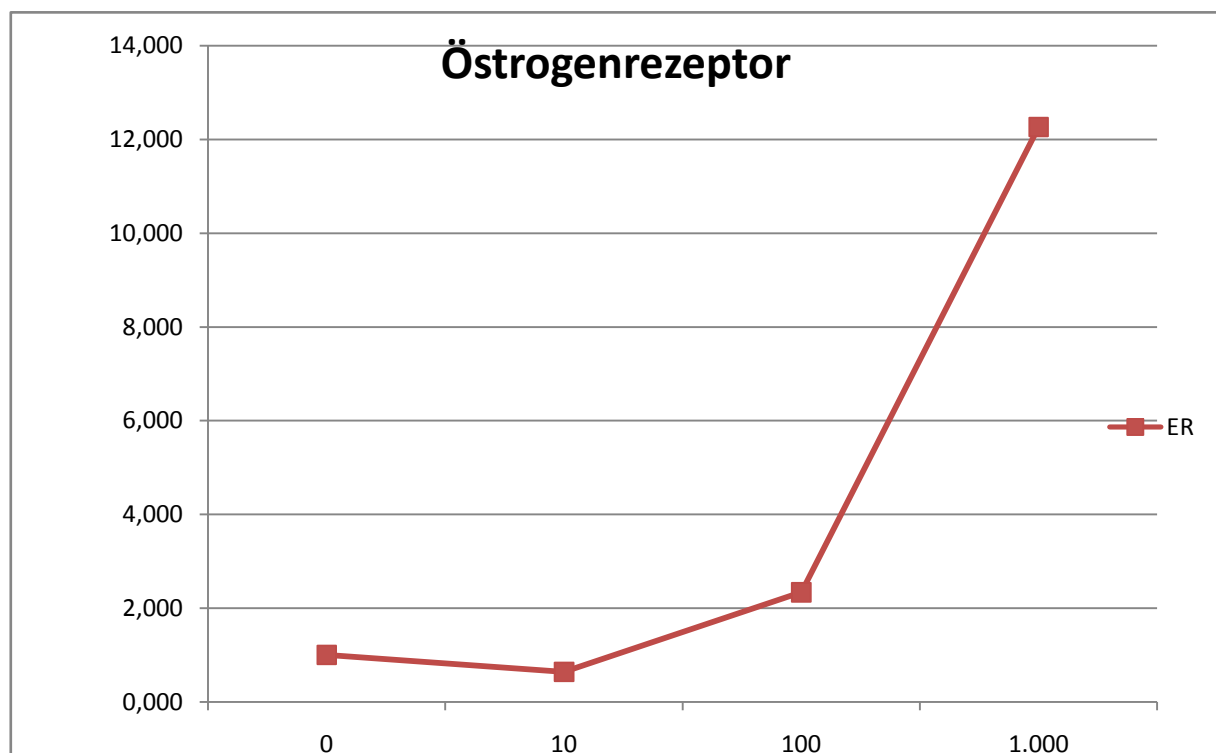


Abbildung 7: Relative Quantifizierung der Genexpression des Östrogenrezeptors in der Konzentrationsreihe

Tumorzellkonzentrationsreihe	0	10	100	1.000
RQ-Wert	nicht detektiert	nicht detektiert	nicht detektiert	nicht detektiert

Tabelle 11: Relative Quantifizierungswerte der Genexpression des Progesteronrezeptors in der Konzentrationsreihe

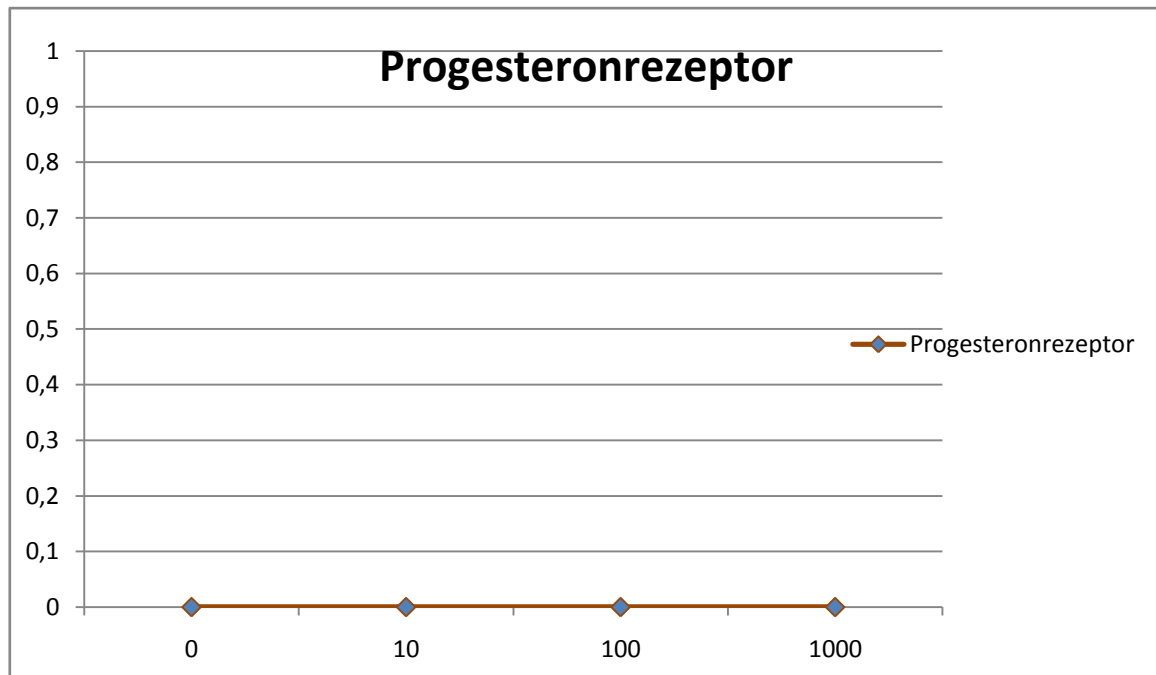


Abbildung 8: Relative Quantifizierung der Genexpression des Progesteronrezeptors in der Konzentrationsreihe

Tumorzellkonzentrationsreihe	0	10	100	1.000
RQ-Wert	1,000	0,898	3,625	12,113

Tabelle 12: Relative Quantifizierungswerte von Ki-67 in der Konzentrationsreihe

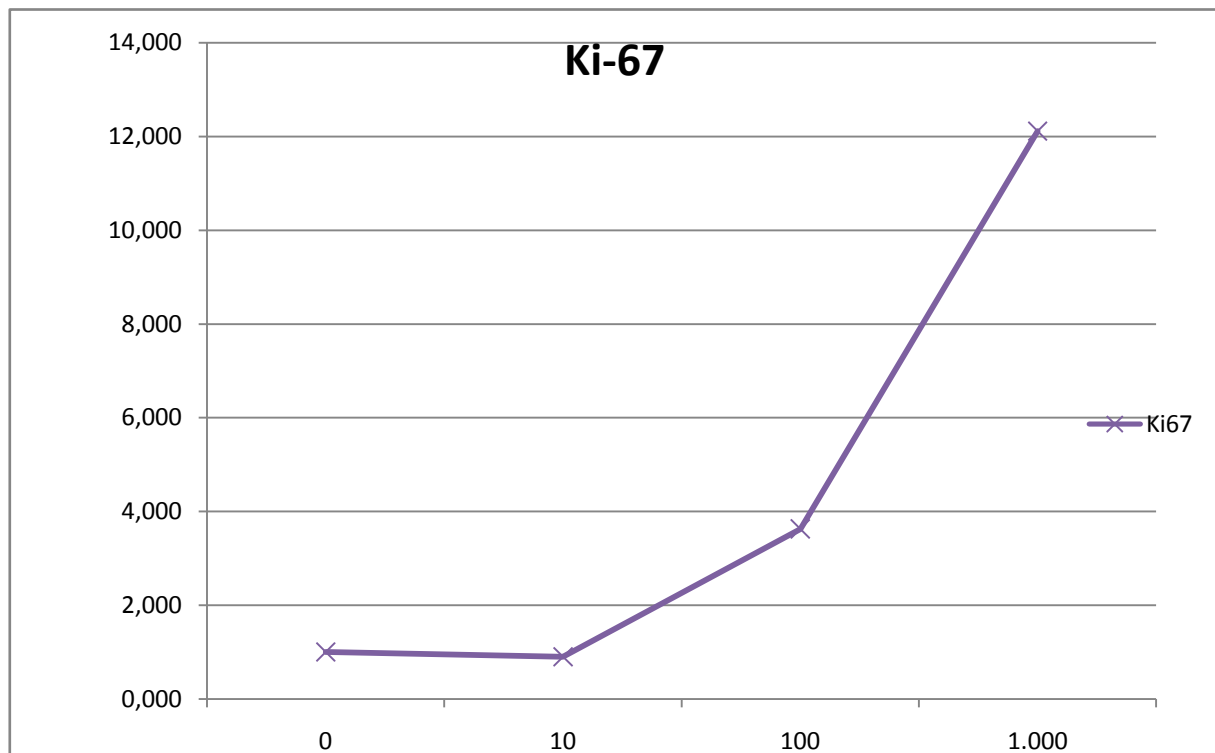


Abbildung 9: Relative Quantifizierung der Genexpression von Ki-67 in der Konzentrationsreihe

Tumorzellkonzentrationsreihe	0	10	100	1.000
RQ-Wert	1,000	0,962	5,561	71,103

Tabelle 13: Relative Quantifizierungswerte von Her2 in der Konzentrationsreihe

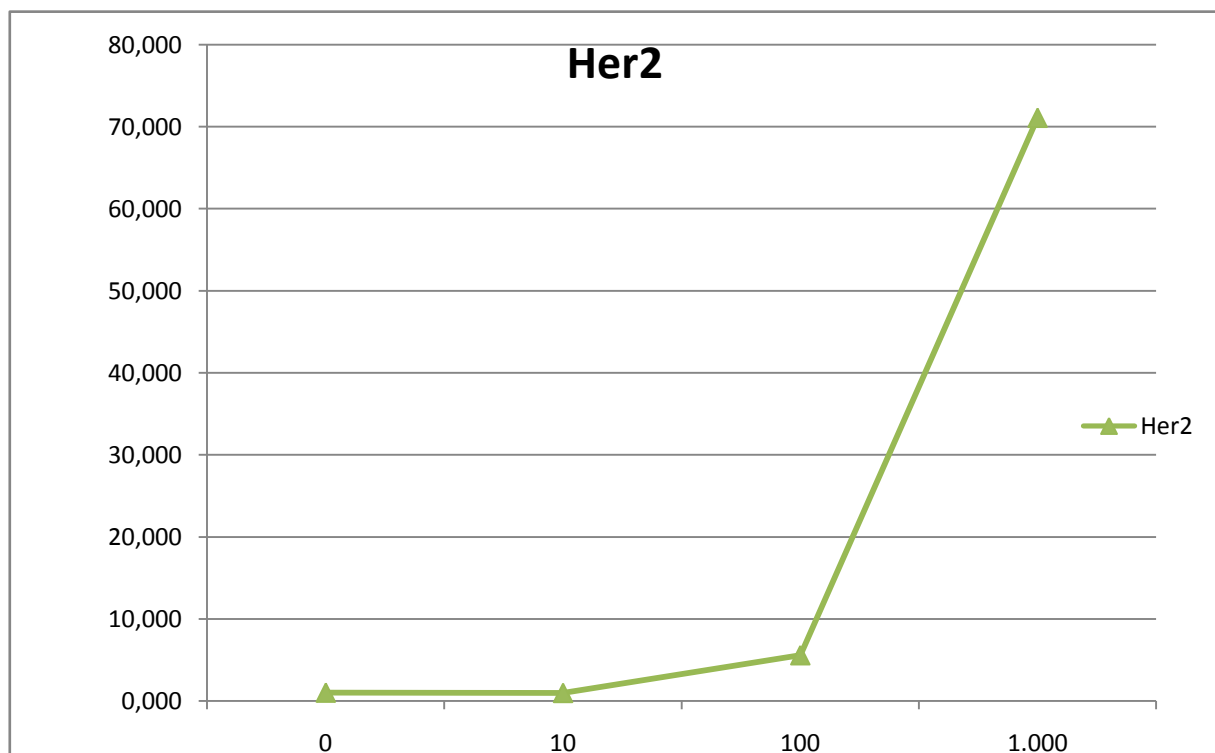


Abbildung 10: Relative Quantifizierung der Genexpression von Her2 in der Konzentrationsreihe

Tumorzellkonzentrationsreihe	0	10	100	1.000
RQ-Wert	1,000	0,381	1,125	1,051

Tabelle 14: Relative Quantifizierungswerte von Bcl2 in der Konzentrationsreihe

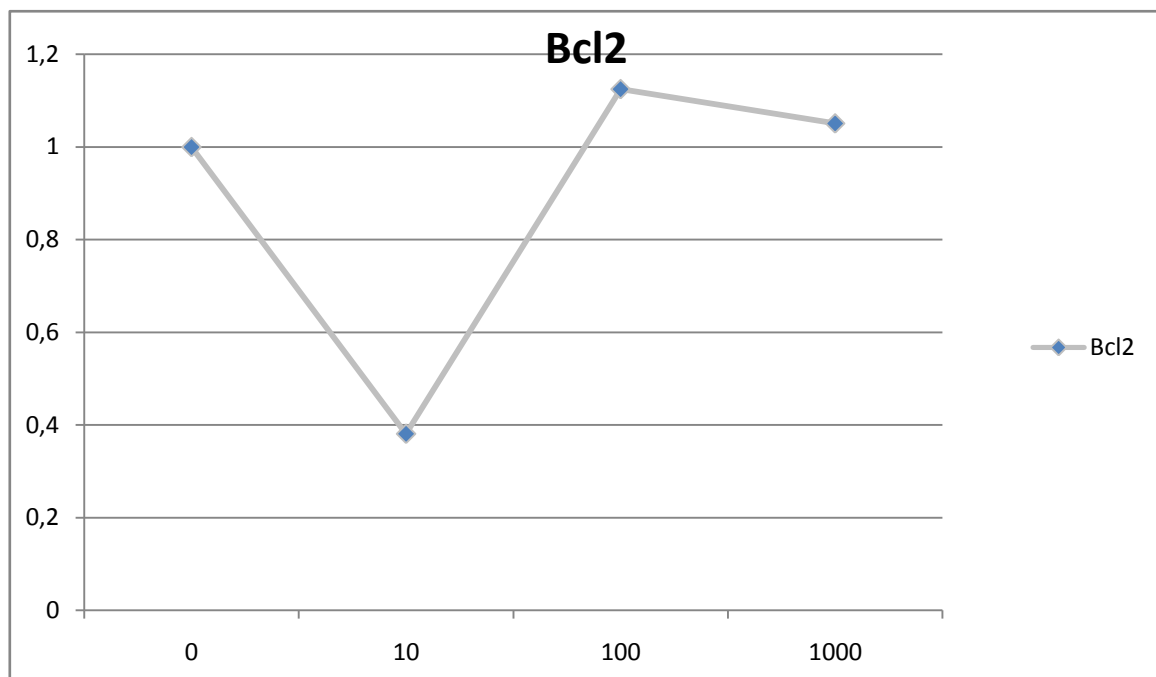


Abbildung 11: Relative Quantifizierung der Genexpression von Bcl2 in der Konzentrationsreihe

Tumorzellkonzentrationsreihe	0	10	100	1.000
RQ-Wert	1,000	0,859	2,227	10,064

Tabelle 15: Relative Quantifizierungswerte von Cathepsin L2 in der Konzentrationsreihe

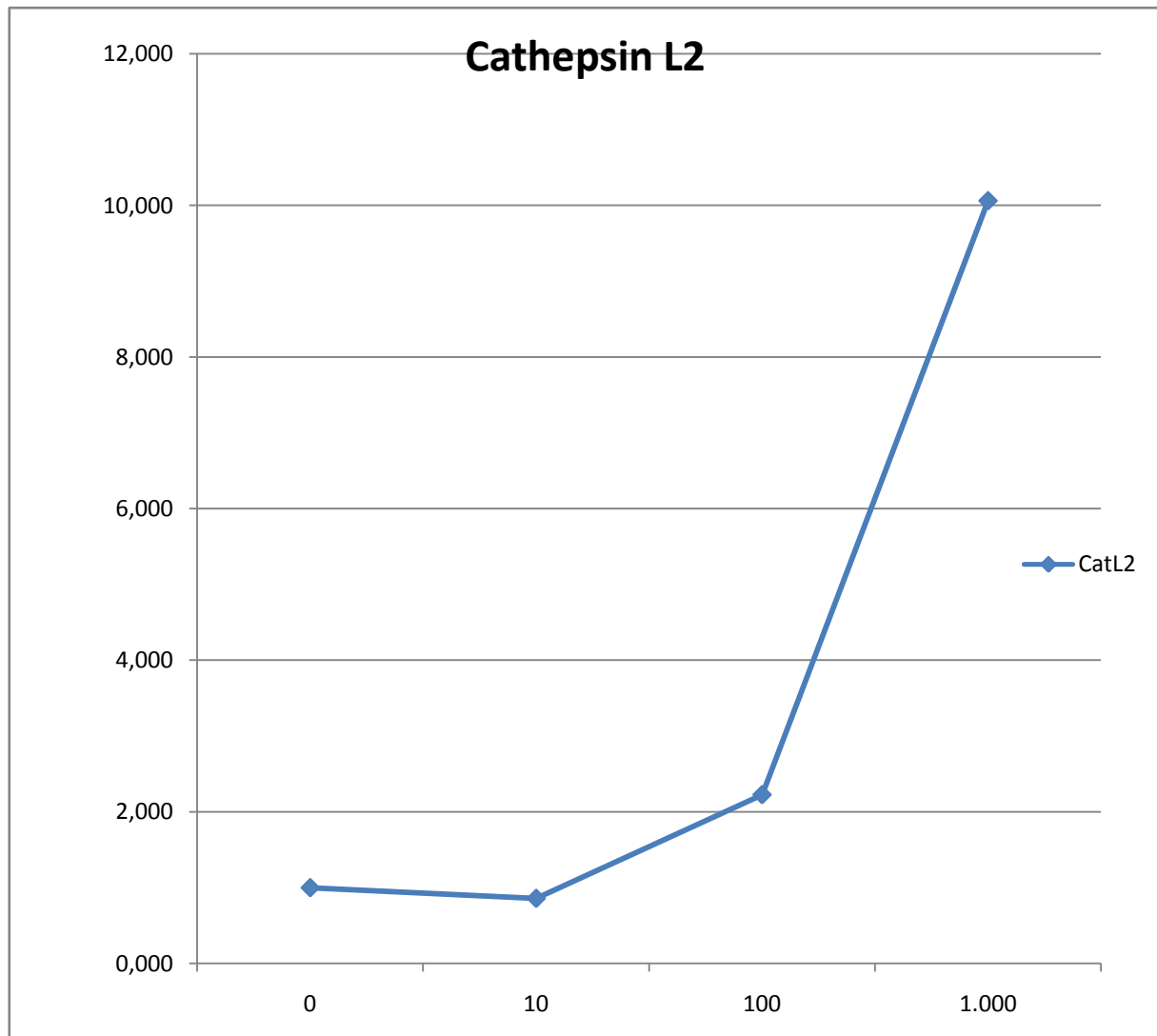


Abbildung 12: Relative Quantifizierung der Genexpression von Cathepsin L2 in der Konzentrationsreihe

In der Zusammenschau der aufgeführten Abbildungen zeigt sich, dass die Genexpressionsanalyse mittels der Polymerase-Kettenreaktion in der Modellbetrachtung für Bcl2 und den Progesteronrezeptor kein zufriedenstellendes Ergebnis hinsichtlich der Verwendbarkeit als Biomarker der Genexpression zirkulierender Tumorzellen darstellt, da sich über die

Konzentrationsreihe von 0 bis 1.000 der Probe pro Milliliter Blut zugegebener Tumorzellen keine messbare analoge Zunahme in den relativen Quantifizierungswerten einstellt. Somit ist nicht gewährleistet, dass ein valides Ergebnis bei der Untersuchung von Probandenproben anhand dieser Marker generiert werden kann.

Dahingegen haben die Modelluntersuchungen der Genexpression für den Östrogenrezeptor, Ki-67, Her2 sowie Cathepsin L2 gezeigt, dass die Marker getreu der zunehmenden Zugabe von CAMA-1-Brustkrebszellen einen Anstieg der relativen Quantifizierungswerte über die Konzentrationsreihe hinweg wiedergeben, sodass diese in Untersuchungen an Blut von Patientinnen Verwendung finden können.

Die folgende Abbildung zeigt die im Weiteren Verwendung findenden Marker mit dem Anstieg ihrer relativen Quantifizierungswerte für zugegebene Konzentrationen von 0 bis 1.000 Krebszellen pro Milliliter Blut in logarithmischer Skalierung zur Basis 10.

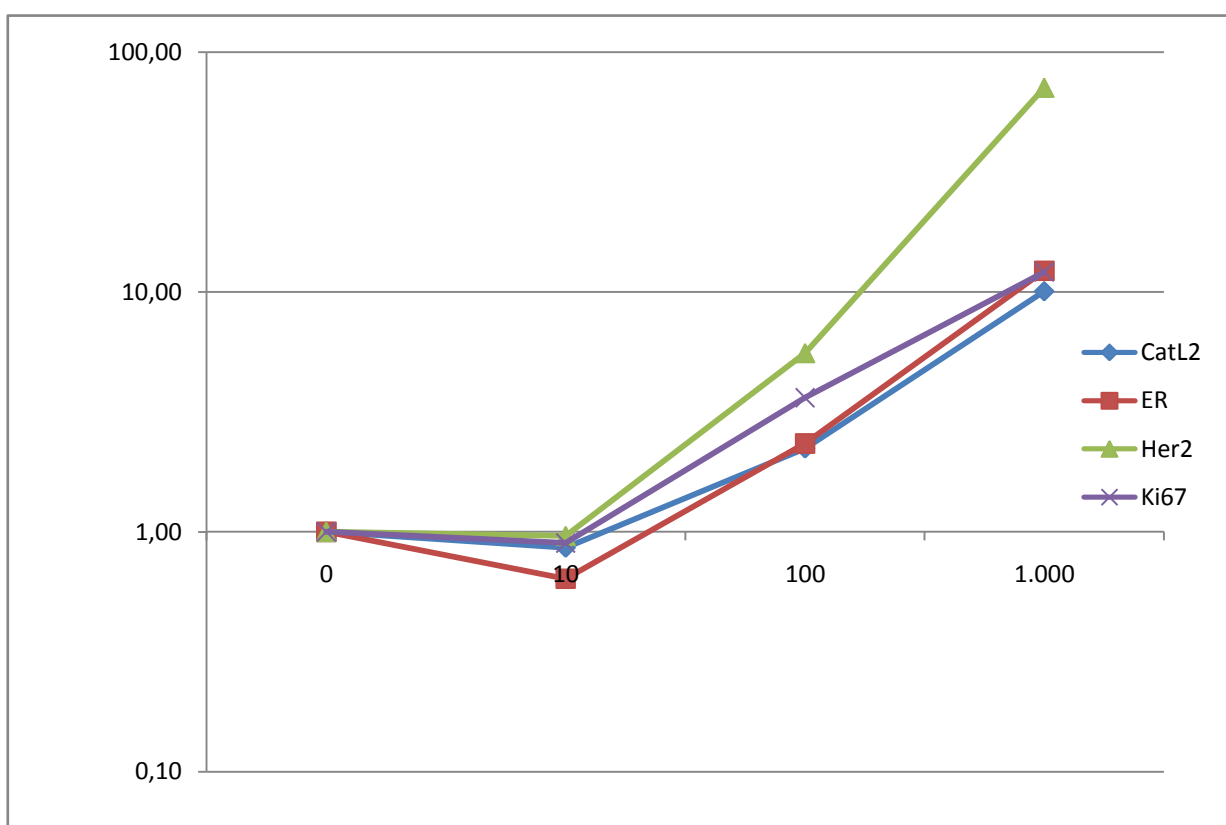


Abbildung 13: Relative Quantifizierung der Genexpression von Biomarkern im Modellsystem (RQ-Werte dekadisch logarithmiert)

3.2 Patientendaten

Für die Untersuchung der Real Time-Polymerase-Kettenreaktion-Marker standen Blutproben von 20 adjuvanten Brustkrebspatientinnen zur Verfügung. Diese wurden im Vorfeld aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Zustimmung zur Verwendung dieser Proben und ihrer Daten zu Forschungszwecken. Das Ethikvotum gemäß der Deklaration von Helsinki mit der Kennung LMU 148-12 liegt dafür vor.

Die folgende Tabelle führt die Biologie des Primarius näher vor Augen, indem Angaben zu TNM-Klassifikation, Grading und Histologie sowie Ki-67-Nachweis und Rezeptorstatus gemacht werden.

Patientin	Alter	T	N	M	Grading	Ki-67	Histologie	Rezeptorstatus		
								Östro- gen (%)	Proges- teron (%)	Her2
1	56	pT1c (18mm)	pN0	Mx	2	n.d.	inv-dukta	90	30	n.d.
2	45	pT3 (58mm)	pN mi	Mx	3	n.d.	inv-dukta	75	neg.	neg.
3	51	pT1c (11mm)	pN0	Mx	3	n.d.	inv-dukta	neg.	neg	pos.
4	65	pT2 (45mm)	pN sn	Mx	2	n.d.	inv-dukta	100	75	neg.
5	59	pT1a (4mm)	pN0	M0	1	10%	inv-dukta	81	5	n.d.
6	63	pT2 (40mm)	pN1a (1/7)	Mx	2	n.d.	inv-lob; DCIS	90	30	neg.
7	61	pT1c (12mm)	pN0	Mx	2	40%	inv-dukta	10	1	neg.
8	76	pT2 (25mm)	pN0	Mx	2	40%	inv-dukta	80	80	neg.
9	57	pT1c (13mm)	pN0	Mx Mx	1	5%	inv-dukta	neg.	neg	neg.
10	54	pT1c (19mm)	pN1a (1/1)	Mx	2	n.d.	inv- dukta/lob	90	90	neg.
11	62	pT1b (11mm)	pN1a (1/2)	Mx	2	n.d.	inv-dukta	100	50	neg.
12	41	cT1b (8mm)	pN0	Mx	2	n.d.	inv-dukta	100	33	n.d.
13	76	pT1c (12mm)	pN1a (1/14)	M0	2	n.d.	inv-dukta	90	90	n.d.
14	53	pyT1a (4mm)	pN1 (1/15)	M0	2	60%	inv-dukta	100	100	pos.
15	58	pT2 (25mm)	pN0	Mx	2	90%	inv-meta- plastisch	0	0	n.d.
16	65	pT2 (38mm)	pN0	Mx	2	n.d.	inv-dukta	90	80	n.d.
17	72	pT1b (9mm)	pN0	M0	2	3%	inv-lobulär	90	5	neg.
18	36	pT2 (30mm)	pN0	Mx	2	60%	inv-lobulär	99	99	neg.
19	77	cT1c (25mm)	pNx	Mx	2	n.d.	n.d.	99	99	n.d.
20	74	cT1b (8,6mm)	pNx	Mx	1	10%	inv-dukta	90	80	neg.

Tabelle 16: Tumorbologische Charakteristika der Primarii adjuvanter Brustkrebspatientinnen
(n.d. = nicht detektiert)

3.3 Vergleich der Genexpression: adjuvante Situation vs. Negativkontrolle

Vergleicht man die gemittelten relativen Quantifizierungswerte der Gruppe adjuvanter Brustkrebspatientinnen mit denen der gesunden Kontrollgruppe, so zeigen sich bemerkenswerte Unterschiede.

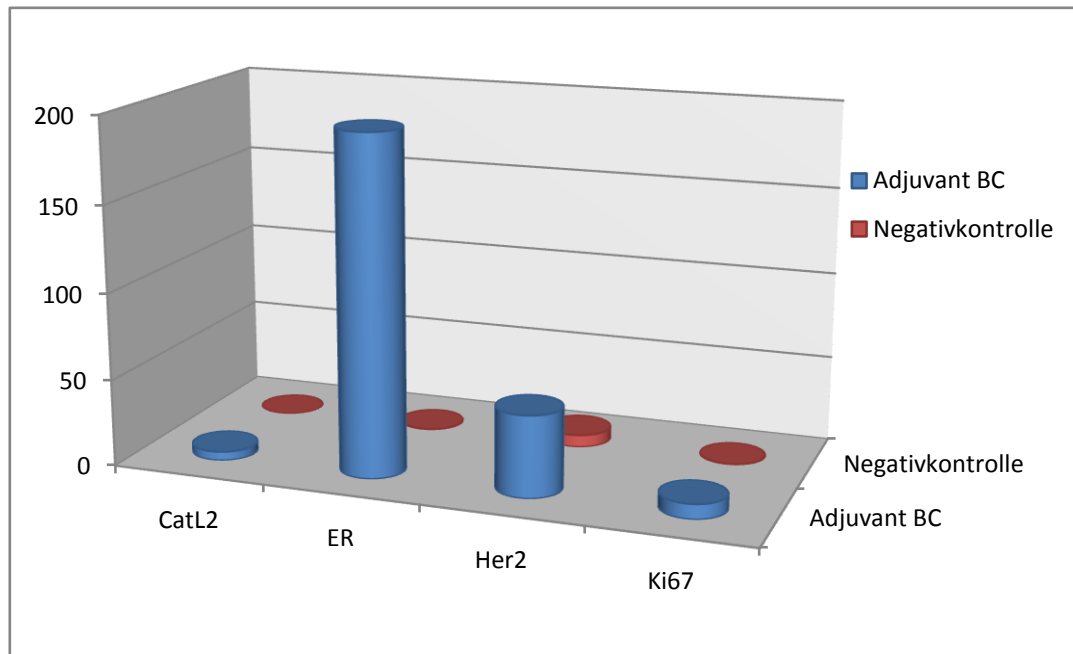


Abbildung 14: Gemittelte Werte der relativen Quantifizierung der Gruppe adjuvanter Brustkrebspatientinnen vs. Negativkontrolle

Gene	Adjuvante Brustkrebsgruppe	Negativkontrolle	Faktor
CatL2	5,070	0,051	99,411
ER	194,513	0,556	349,844
Her2	47,041	7,108	6,618
Ki-67	8,611	0,523	16,465

Tabelle 17: Gemittelte Werte der relativen Quantifizierung adjuvanter Brustkrebspatientinnen vs. Negativkontrolle und Unterschiedsfaktor

Es wird ersichtlich, dass der Durchschnittswert der Genexpression für Cathepsin L2 in der Gruppe der adjuvanter Brustkrebspatientinnen gegenüber dem gemittelten Wert der Kontrollgruppe um nahezu den Faktor 100 größer ist. Der Östrogenrezeptor weist eine um annähernd 350-fach vermehrte Expressionsrate im Vergleich zur Kontrolle auf. Die Expression von Her2 ist mit immer noch 6,6-facher Erhöhung des gemittelten Wertes der relativen Quantifizierung ebenfalls deutlich über dem

Wert der Negativkontrolle. Gleiches gilt für Ki-67 mit einem um den Faktor 16 größeren Mittelwert für die Gruppe der Proben von adjuvanten Brustkrebspatientinnen im Vergleich zur Kontrolle.

3.4 Real Time-PCR-Ergebnisse adjuvanter Brustkrebspatientinnen

Die folgende Tabelle stellt die relativen Quantifizierungswerte der adjuvanten Brustkrebspatientinnen zusammen mit den biologischen Charakteristika ihres jeweiligen Primarius dar.

Patientin	Alter	T	N	M	Grading	Ki67	Histologie	Östro- gen (%)	Proges- teron (%)	Her2	Cet L2	ER	Her2	Ki67
1	56	pT1c (18mm)	pN0	Mx	2	n.d.	inv-duktral	90	30	n.d.	5,999	2,991	45,100	5,124
2	45	pT3 (58mm)	pN mi	Mx	3	n.d.	inv-duktral	75	neg.	neg.	n.d.	340,124	n.d.	n.d.
3	51	pT1c (11mm)	pN0	Mx	3	n.d.	inv-duktral	neg.	neg.	pos.	0,074	0,968	34,274	0,091
4	65	pT2 (45mm)	pN sn	Mx	2	n.d.	inv-duktral	100	75	neg.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	59	pT1a (4mm)	pN0	M0	1	10%	inv-duktral	81	5	n.d.	60,210	2636,145	645,283	97,689
6	63	pT2 (40mm)	pN1a (1/7)	Mx	2	n.d.	inv-lob; DCIS	90	30	neg.	n.d.	394,367	84,579	8,251
7	61	pT1c (12mm)	pN0	Mx	2	40%	inv-duktral	10	1	neg.	0,920	9,592	134,125	3,162
8	76	pT2 (25mm)	pN0	Mx	2	40%	inv-duktral	80	80	neg.	n.d.	n.d.	0,109	n.d.
9	57	pT1c (13mm)	pN0	Mx Mx	1	5%	inv-duktral	neg.	neg.	neg.	0,081	n.d.	1,597	0,954
10	54	pT1c (19mm)	pN1a (1/1)	Mx	2	n.d.	inv-duktral/lob	90	90	neg.	0,389	1,105	0,381	0,537
11	62	pT1b (11mm)	pN1a (1/2)	Mx	2	n.d.	inv-duktral	100	50	neg.	n.d.	478,4	n.d.	n.d.
12	41	cT1b (8mm)	pN0	Mx	2	n.d.	inv-duktral	100	33	n.d.	n.d.	1,170	n.d.	0,757
13	76	pT1c (12mm)	pN1a (1/14)	M0	2	n.d.	inv-duktral	90	90	n.d.	n.d.	10,124	n.d.	n.d.
14	53	pT1a (4mm)	pN1 (1/15)	M0	2	60%	inv-duktral	100	100	pos.	8,234	3,154	2,912	26,336
15	58	pT2 (25mm)	pN0	Mx	2	90%	inv-metaplastisch	0	0	n.d.	25,227	2,167	2,086	23,636
16	65	pT2 (38mm)	pN0	Mx	2	n.d.	inv-duktral	90	80	n.d.	n.d.	7,259	n.d.	5,158
17	72	pT1b (9mm)	pN0	M0	2	3%	inv-lobulär	90	5	neg.	0,057	0,879	0,153	0,136
18	36	pT2 (30mm)	pN0	Mx	2	60%	inv-lobulär	99	99	neg.	0,017	0,736	0,060	0,040
19	77	cT1c (25mm)	pNx	Mx	2	n.d.	n.d.	99	99	?	0,172	0,664	0,116	0,245
20	74	cT1b (8,6mm)	pNx	Mx	1	10%	inv-duktral	90	80	neg.	0,019	0,370	0,035	0,105

Tabelle 18: Relative Quantifizierungswerte und Patientendaten
(n.d. = nicht detektiert)

3.4.1 Genexpression und Tumorcharakteristika

Betrachtet man die Patientinnen 2, 5 und 6 so erkennt man, dass diese teils sehr hohe relative Quantifizierungswerte aufweisen. Dabei ist festzustellen, dass der biologisch niedrig maligne Tumor der Patientin 5 mit einem Grading von 1 und einem Ausmaß von 4mm sowie keiner Lymphknotenbeteiligung durchgehend sehr hohe Genexpressionswerte der untersuchten Marker zeigt.

Patientin	Alter	T	N	M	Grading	Ki67	Histologie	Rezeptorstatus			Relativer Quantifizierungswert			
								Östro- gen (%)	Proges- teron (%)	Her2	Cat L2	ER	Her2	Ki67
2	45	pT3 (58mm)	pN mi	Mx	3	n.d.	inv-dukta	75	neg.	neg.	n.d.	340,124	n.d.	n.d.
5	59	pT1a (4mm)	pN0	M0	1	10%	inv-dukta	81	5	n.d.	60,210	2636,145	645,283	97,689
6	63	pT2 (40mm)	pN1a (1/7)	Mx	2	n.d.	inv-lob; DCIS	90	30	neg.	n.d.	394,367	84,579	8,251

**Tabelle 19: Hohe RQ-Werte adjuvanter Brustkrebspatientinnen
(n.d. = nicht detektiert)**

Demgegenüber weist die Blutprobe beispielsweise der Patientin 18, deren Primarius ein Ausmaß von 30mm hat und ein Grading von 2, durchgehend niedrige Genexpressionswerte auf.

Patientin	Alter	T	N	M	Grading	Ki67	Histologie	Rezeptorstatus			Relativer Quantifizierungswert			
								Östro- gen (%)	Proges- teron (%)	Her2	Cat L2	ER	Her2	Ki67
17	72	pT1b (9mm)	pN0	M0	2	3%	inv-lobulär	90	5	neg.	0,057	0,879	0,153	0,136
18	36	pT2 (30mm)	pN0	Mx	2	60%	inv-lobulär	99	99	neg.	0,017	0,736	0,060	0,040
19	77	cT1c (25mm)	pNx	Mx	2	n.d.	n.d.	99	99	?	0,172	0,664	0,116	0,245
20	74	cT1b (8,6mm)	pNx	Mx	1	10%	inv-dukta	90	80	neg.	0,019	0,370	0,035	0,105

**Tabelle 20: Niedrige RQ-Werte adjuvanter Brustkrebspatientinnen
(n.d. = nicht detektiert)**

Auffallend ist überdies, dass die Patientinnen 17 bis 20 durchgehend RQ-Werte <1 detektieren lassen, wobei für alle vier Patientinnen gilt, dass ihr Östrogenrezeptorstatus mit mindestens 90% positiv evaluiert wurde. Dieses Expressionsmuster des Primarius lässt sich im peripheren Blut nicht analog in einer Hochregulierung für den Östrogenrezeptor in der Polymerase-Kettenreaktion zeigen.

In der Zusammenschau ergibt sich, dass aus dem vorliegenden Datensatz keine statistisch signifikante, korrelative Aussage zwischen Tumorgöße und relativen Quantifizierungswerten zu erheben ist. Gleiches gilt für das Grading des Tumors und den Lymphknotenstatus.

3.4.2 Triple-negativer Primarius und Genexpression

Ein interessanter Aspekt bei der Analyse der Resultate der Real Time-Polymerase-Kettenreaktion ist ebenfalls der Umstand, dass auch bei Triple-Negativität des Primarius ein gewisser Anstieg der Genexpressionswerte für Her2 respektive den Östrogenrezeptor bei den Patientinnen 9 und 15 zu verzeichnen ist.

Patientin	Alter	T	N	M	Grading	Ki67	Histologie	Rezeptorstatus			Relativer Quantifizierungswert			
								Östro- gen (%)	Proges- teron (%)	Her2	Cat L2	ER	Her2	Ki67
9	57	pT1c (13mm)	pN0	Mx Mx	1	5%	inv-dukta	neg.	neg	neg.	0,081	n.d.	1,597	0,954
15	58	pT2 (25mm)	pN0	Mx	2	90%	inv-meta- plastisch	0	0	n.d.	25,227	2,167	2,086	23,636

**Tabelle 21: RQ-Werte und Triple-Negativität
(n.d. = nicht detektiert)**

3.4.3 Cathepsin L2-Hochregulation

Der mit Invasion und Malignität assoziierte Marker Cathepsin L2 ist bei vier Patientinnen deutlich hochreguliert.

Patientin	Alter	T	N	M	Grading	Ki67	Histologie	Rezeptorstatus			Relativer Quantifizierungswert			
								Östro- gen (%)	Proges- teron (%)	Her2	Cat L2	ER	Her2	Ki67
1	56	pT1c (18mm)	pN0	Mx	2	n.d.	inv-dukta	90	30	n.d.	5,999	2,991	45,100	5,124
5	59	pT1a (4mm)	pN0	M0	1	10%	inv-dukta	81	5	n.d.	60,210	2636,145	645,283	97,689
14	53	pyT1a (4mm)	pN1 (1/15)	M0	2	60%	inv-dukta	100	100	pos.	8,234	3,154	2,912	26,336
15	58	pT2 (25mm)	pN0	Mx	2	90%	inv-meta- plastisch	0	0	n.d.	25,227	2,167	2,086	23,636

**Tabelle 22: Patientinnen mit erhöhter Genexpression von Cathepsin L2
(n.d. = nicht detektiert)**

Bemerkenswert ist die gleichzeitig auftretende hohe Expression für Ki-67, wobei das Grading des Primärtumors der Patientinnen eine mäßige bis gute Differenzierung angibt. Das Tumorausmaß überschreitet dabei auch für keine der Patientinnen das T2-Stadium.

3.4.4 Ki-67-Nachweis

Ebenso lohnt eine Betrachtung des Patientenkollektivs hinsichtlich des Proliferationsfaktors Ki-67.

Patientin	Alter	T	N	M	Grading	Ki67	Histologie	Rezeptorstatus			Relativer Quantifizierungswert			
								Östro- gen (%)	Proges- teron (%)	Her2	Cat L2	ER	Her2	Ki67
5	59	pT1a (4mm)	pN0	M0	1	10%	inv-dukta	81	5	n.d.	60,210	2636,145	645,283	97,689
7	61	pT1c (12mm)	pN0	Mx	2	40%	inv-dukta	10	1	neg.	0,920	9,592	134,125	3,162
8	76	pT2 (25mm)	pN0	Mx	2	40%	inv-dukta	80	80	neg.	n.d.	n.d.	0,109	n.d.
9	57	pT1c (13mm)	pN0	Mx Mx	1	5%	inv-dukta	neg.	neg.	neg.	0,081	n.d.	1,597	0,954
14	53	pyT1a (4mm)	pN1 (1/15)	M0	2	60%	inv-dukta	100	100	pos.	8,234	3,154	2,912	26,336
15	58	pT2 (25mm)	pN0	Mx	2	90%	inv-meta- plastisch	0	0	n.d.	25,227	2,167	2,086	23,636
17	72	pT1b (9mm)	pN0	M0	2	3%	inv-lobulär	90	5	neg.	0,057	0,879	0,153	0,136
18	36	pT2 (30mm)	pN0	Mx	2	60%	inv-lobulär	99	99	neg.	0,017	0,736	0,060	0,040
20	74	cT1b (8,6mm)	pNx	Mx	1	10%	inv-dukta	90	80	neg.	0,019	0,370	0,035	0,105

**Tabelle 23: RQ-Werte und Ki-67-Nachweis
(n.d. = nicht detektiert)**

Für die Patientinnen 14 und 15, die einen hohen Ki-67-Wert in der Histologie ihres Primarius aufweisen, zeigt sich ebenso eine sehr hohe relative Quantifizierung in der Polymerase-Kettenreaktion. Bei Patientin 15, die unter Umständen ein triple-negatives Karzinom aufweist, ist dies besonders interessant, hinsichtlich einer möglichen prognostischen Aussagekraft. Auch für die Patientinnen 5 und 7 mit moderaterem Ki-67-Nachweis im Tumorpräparat zeigen sich erhöhte RQ-Werte in der Real Time-PCR.

Nichtsdestotrotz ist festzuhalten, dass bei weiteren Patientinnen mit einem Ki-67-Nachweis von bis zu 60% eine relative Quantifizierung <1 zu notieren ist, sodass kein eindeutiges Bild hinsichtlich einer klaren Korrelation zwischen Nachweis von Ki-67 am Präparat und Ausmaß der Expression im peripheren Blut zu sehen ist.

3.4.5 Her2-Switch

Untersucht man schließlich das Kollektiv der adjuvanten Brustkrebspatientinnen hinsichtlich des Her2-Status des Primärtumors und der relativen Quantifizierung für Her2 in der Real Time-Polymerase-Kettenreaktion, so lässt sich Bemerkenwertes feststellen.

Patientin	Alter	T	N	M	Grading	Ki67	Histologie	Rezeptorstatus		Her2	Relativer Quantifizierungswert			
								Östro- gen (%)	Proges- teron (%)		Cat L2	ER	Her2	Ki67
6	63	pT2 (40mm)	pN1a (1/7)	Mx	2	n.d.	inv-lob; DCIS	90	30	neg.	n.d.	394,367	84,579	8,251
7	61	pT1c (12mm)	pN0	Mx	2	40%	inv-dukta	10	1	neg.	0,920	9,592	134,125	3,162
9	57	pT1c (13mm)	pN0	Mx Mx	1	5%	inv-dukta	neg.	neg.	neg.	0,081	n.d.	1,597	0,954

**Tabelle 24: RQ-Werte und Her2-Switch
(n.d. = nicht detektiert)**

Die Patientinnen 6 und 7, die einen Her2-negativen Primarius aufweisen, zeigen exorbitant hohe Werte der relativen Quantifizierung für Her2. Auch für Patientin 9 ist bei initialer Her2-Negativität eine Hochregulation in der Blutprobe zu sehen. Dies lässt vermuten, dass im peripheren Blut Tumorzellen zirkulieren könnten, die Her2-positiv sind und damit eine Eigenschaft aufweisen, die sie von ihrem Primärtumor unterscheiden. Dieses Phänomen ist in der Literatur als Her2-Switch bekannt [1, 229-231].

3.4.6 Statistische Auswertung

Die statistische Evaluation der relativen Quantifizierungswerte in unterschiedlichen Patientensubgruppen ergab auf dem Signifikanzniveau von 5% keine statistische Signifikanz. Die Expressionswerte der 20 Patientinnen wurden dabei hinsichtlich Alter, Tumorausmaß anhand des T-Stadiums, Lymphknotenstatus, Grading des Primarius sowie Positivität des Östrogen- und Progesteronrezeptors untersucht. Die nachfolgende Tabelle gibt die Ergebnisse als p-Werte der statistischen Analyse der Subgruppenuntersuchungen für die jeweiligen Zielgene wieder.

Vergleichskomponente	Cathepsin L2	ER	Her2	Ki-67
Alter (<60 Jahre vs. >60 Jahre)	0,2345	0,8474	0,3362	0,6374
Tumorausmaß (T1 vs. T2-4)	0,8229	0,5271	0,4785	0,5139
Lymphknotenstatus (N0 vs. N1-2)	0,8561	0,6304	0,4634	0,9891
Grading (1 vs. 2-3)	0,7506	0,9888	0,8251	0,3792
Östrogenrezeptor (<90% Positivität vs. >90% Positivität)	0,2912	0,2689	0,4634	0,1949
Progesteronrezeptor (<80% Positivität vs. >80% Positivität)	0,3367	0,3291	0,3662	0,1573

Tabelle 25: p-Werte der statistischen Auswertung der RQ-Werte in Patientensubgruppen

4 Diskussion

4.1 Methodischer Ansatz

Dass zirkulierende Tumorzellen eine wesentliche Komponente des Wesens maligner Erkrankungen darstellen, ist mehr und mehr im Bewusstsein, weshalb ihr Vorhandensein bereits Eingang in die TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms gehalten hat. Vor dem Hintergrund dessen, dass es eine große Herausforderung darstellt, zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut angesichts der Relation der Zellzahlen zu detektieren, stellt die Real Time-Polymerase-Kettenreaktion eine Methode hoher Sensitivität dar [2, 190].

Um sich dem Phänomen der minimalen Resterkrankung anzunähern, hat es sich bewährt, aufgrund einfacherer Handhabbarkeit die Untersuchung des peripheren Bluts gegenüber der aufwändigeren und invasiveren Knochenmarkpunktion vermehrt in den Fokus zu nehmen [172].

Die Erprobung potentieller Markergene, die für die Real Time-Polymerase-Kettenreaktion Verwendung finden können, gibt im Modellsystem die Möglichkeit, unabhängig von der Biologie eines zugrundeliegenden Primarius und zunächst ohne den Bedarf an klinischen Proben eine Evaluation durchzuführen. Unter Verwendung von Brustkrebszelllinien konnte schon in anderen Veröffentlichungen gezeigt werden, dass auf diese Weise valide Marker der Polymerase-Kettenreaktion identifiziert werden können [232, 233].

Um ein umfassenderes Bild der biologischen Charakteristika zirkulierender Tumorzellen und damit ein besseres Verständnis der minimalen Resterkrankung zu erhalten, ist es essentiell, Verfahren anzuwenden, die über Detektion und Quantifizierung hinausgehen, wobei bislang hierfür nur das CellSearch® System zugelassen ist, sodass in diesem Forschungsfeld weitere Anstrengungen unternommen werden müssen.

Während das CellSearch® System nach Zellanreicherungsverfahren in der Lage ist, die Detektion und Quantifizierung zirkulierender Tumorzellen in großem Probenumsatz vorzunehmen und damit Eignung für die klinische Routine aufweist, ist die Polymerase-Kettenreaktion neben ihrem Vorteil, charakteristische Eigenschaften anhand der Analyse von Genexpressionsmustern zu erschließen, mit dem Nachteil behaftet, mehrere Vorbereitungsschritte durchlaufen zu müssen, um zur Anwendung kommen zu können. Auch in dieser vorbereitenden Phase ist auf sorgfältige Durchführung der Experimente zu achten, um beispielsweise eine Kontamination der Proben durch den Kontakt mit RNasen zu vermeiden.

Schwierigkeiten im Umgang mit der Polymerase-Kettenreaktion selbst sind dabei abzusehen, dass sie eine diffizile Methode sein kann, sodass beispielsweise die untersuchten potentiellen Marker

Progesteronrezeptor und Bcl2 nach Evaluation des Modellsystems ausgeschlossen werden mussten, da sie nicht in ausreichendem Maße in ihrem Fluoreszenzsignal in der Real Time-Polymerase-Kettenreaktion detektiert werden konnten.

Allerdings zeigt sich in der Betrachtung relativer Quantifizierungswerte von Patientenproben, dass durch diese Methode interessante Feststellungen erhoben werden können, die einer eingehenderen Analyse lohnen.

4.2 Epithelial-mesenchymale Transition

Der Umstand, dass zirkulierende Tumorzellen das Phänomen, das mit einer epithelial-mesenchymalen Transition bezeichnet wird, durchlaufen, stellt eine Schwierigkeit bei der Detektion und Charakterisierung dieser Zellen dar. Die Unterscheidung zirkulierender Tumorzellen, die primär epithelialen Ursprungs sind, von gesunden Blutzellen mesenchymalen Aufbaus wird dadurch erschwert [5, 234, 235]. Aufgrund des Wechsels in der Morphologie und den ausbildenden Eigenschaften dieser Zellen besteht das Risiko, diese mit der jeweils eingesetzten Detektionsmethode nicht hinreichend zu erfassen [236]. Problematisch ist, dass diese Zellen neben epithelialer und mesenchymaler Erscheinung auch eine intermediäre Form annehmen können [5, 237].

Dadurch, dass die im peripheren Blut zirkulierenden Tumorzellen epitheliale Eigenschaften verlieren, um mesenchymale anzunehmen, entgehen sie bislang etablierten Detektionsmethoden wie dem CellSearch® System, das auf der Auffindung epithelialer Zelladhäsionsmoleküle beruht [238]. Gerade diese Zellen, die sich in Transition befinden oder die Fähigkeit zu dieser in sich tragen, sind jedoch von großem Interesse, da vor allem von diesen Migration und Invasion ausgehen kann, was Tumorprogression, Metastasierung und Krankheitsrezidiv bedeutet [155, 156]. Das Vorliegen derartiger zirkulierender Tumorzellen ist somit mit einer schlechteren Prognose für die Patientinnen verbunden [181].

Es gilt somit, dass ein umfassender Ansatz entwickelt werden muss, um sowohl zirkulierende Tumorzellen epithelialer als auch mesenchymaler Ausprägung und Phänotyps mit möglichen Zwischenformen zu identifizieren. Dabei ist es wichtig zu verstehen, welche Mechanismen und Signaltransduktionswege wirken, um einen Übergang innerhalb dieser Ausprägungsformen stattfinden zu lassen.

Die Vorgänge und Auslöser, die diese in Gang bringen, sind Gegenstand gegenwärtiger Forschung. Neben verschiedensten Signaltransduktionskaskaden werden Inflammation, azidotisches Milieu, Hypoxie und die Beschaffenheit des Mikroenvironments des Tumors diskutiert, einen Beitrag zu leisten, zu einer epithelial-mesenchymalen Transition zu führen [5].

Da derzeit etabliert verwendete Methoden zur Detektion zirkulierender Tumorzellen eine gewisse Verblindung bezüglich in Transition befindlicher Zellen aufweisen, werden Anstrengungen unternommen, neue Verfahren zu evaluieren, um diese Schwachstelle gängiger Verfahren aufzuheben. Ansatzpunkte hierfür sind neben der Verwendung von Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion und spezifischer Antikörper auf Zelloberflächenproteine und Bestandteile der extrazellulären Matrix beispielsweise die RNA-In-situ-Hybridisierung oder Fluoreszenz-magnetische Nanoproben [5, 239, 240].

Mit Informationen hinsichtlich der Charakteristika dieser in Transition befindlicher Zellen wäre großer Erkenntnisgewinn über die Pathogenität der minimalen Resterkrankung, dem Prozess der Metastasierung per se sowie der Karzinogenese in ihrer Gesamtheit verbunden. Dies ist auch insofern von so überragender Bedeutung, da sich diese Eigenschaften erheblich von denen des Primarius unterscheiden können und sich somit eine minimale Resterkrankung der Erfassung klinischer Entscheidungsparameter entziehen kann, die jedoch selbst zum Ziel einer für sie spezifischen Therapie werden sollte.

4.3 Heterogenität des Primärtumors

Neben der möglichen Heterogenität im peripheren Blut auftretender zirkulierender Tumorzellen ist auch eine heterogene Biologie des Primärtumors in Betracht zu ziehen, was wiederum Einfluss auf das Wesen der minimalen Resterkrankung haben kann.

Heterogenität innerhalb eines Tumors beschreibt die Koexistenz verschiedener Krebszellsubpopulationen, die sich hinsichtlich Geno- wie Phänotyp voneinander abheben, was auch zwischen Primarius und Metastase festgestellt werden kann [241]. Ursächlich hierfür wird das Vorhandensein von Krebsstammzellen und klonale Evolution diskutiert, wobei natürliche Selektion im Sinne Darwins im Hinblick auf Umwelteinflüsse beispielsweise in Form einer durchgeführten Therapie beleuchtet wird [241-244].

Untersuchungen an Mammakarzinompräparaten zeigen, dass mittels komparativer genomischer Hybridisierung sowie paralleler Sequenzierung intratumorale Heterogenität nachgewiesen werden kann [245-247]. Besonders in metaplastischem Brustkrebs ist dabei genetische Heterogenität zu sehen, was sich auf Variabilität hinsichtlich biologischer Eigenschaften des Tumors niederschlägt [245]. Ähnliche Beobachtungen konnten in triple-negativem Brustkrebs gemacht werden [241, 248]. Weitere Publikationen führen vor Augen, dass Primarius und Metastase erhebliche Abweichungen im Genmaterial aufweisen können, sodass anzunehmen ist, dass eine Metastase von einer Subzellpopulation des Primarius oder gar unmittelbar von Zellpopulationen einer anderen Metastase ausgehen kann [241, 249, 250]. Auf diese Weise kann sich das Bild einer systemischen

Krebserkrankung ergeben, das nicht die vorwiegend zu diagnostizierenden Eigenschaften des ursprünglichen Tumors widerspiegelt.

Dies kann sich in der Auswertung der Patientenproben neben einem zu bemerkenden Her2-Switch beispielsweise in der Diskrepanz bezüglich des Ki-67-Nachweises zeigen. Hierbei ist auffällig, dass im Blut mancher Probandinnen keine erhöhte Expression festzustellen ist, obwohl der Primarius einen positiven Ki-67-Nachweis aufweist. Weiteres gilt bei Patientinnen mit triple-negativem Mammakarzinom, deren Blut dennoch erhöhte Genexpressionswerte für Her2 oder den Östrogenrezeptor offenbart. Darüberhinaus sind RQ-Werte <1 hinsichtlich des Östrogenrezeptors bei Patientinnen mit deutlich Östrogen-positivem Primarius ebenso bemerkenswert.

Aus der möglichen Vielgestaltigkeit der Brustkrebserkrankung erwachsen besondere Herausforderungen für Diagnose und Therapie – einerseits, wenn die Erfassung intratumoraler Heterogenität neue Untersuchungsmethoden des Primärtumors erfordert, andererseits, wenn Gegebenheiten wie beispielsweise Heterogenität des Tumors bezüglich des Her2-Status berücksichtigt werden sollten [241, 251, 252]. Diese Herausforderung wird in Kapitel 4.5 vertiefend beleuchtet.

Es ist in der Diskussion, inwiefern zirkulierende Tumorzellen als Surrogatparameter für Tumorerheterogenität dienen können [241]. Dies birgt jedoch die Schwierigkeit, inwieweit die detektierten und charakterisierten Tumorzellen für den gesamten Primärtumor, einzelne Subzellpopulationen oder Zellpopulationen metastatischer Zellverbände stehen.

Analog sollte hinsichtlich der Interpretation der Detektion und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen Tumorerheterogenität bedacht werden.

4.4 Detektion und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen

Ist man sich den Phänomenen um epithelial-mesenchymale Transition und intratumorale Heterogenität bewusst, so ist klar, welche Komplexität mit der Detektion und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen einhergeht. Es ist initial notwendig, eine jede Tumorzelle unabhängig von morphologischen oder genotypischen Veränderungen auszumachen und dabei sicher von gesunden Zellen abzugrenzen. Bei der Interpretation der Eigenschaften der detektierten Zellen ist es wesentlich, einen Ansatz zu finden, der Aussagen zu treffen erlaubt, inwiefern die Erscheinungsform zirkulierender Tumorzellen die Biologie des Primarius reflektiert und welche Stellung diese Zellen innerhalb der systemischen Krebserkrankung der Patientin, auch in Form der minimalen Resterkrankung, einnehmen und repräsentieren.

Die Konsequenz dessen, dass zirkulierende Tumorzellen dem Primärtumor fremde Charakteristika aufweisen können, ist, dass es erforderlich ist, diese aufzuspüren, um Patientinnen eine spezifische Therapie ihrer Krebserkrankung anbieten zu können.

Eine Hürde der Polymerase-Kettenreaktion ist hierbei auch, dass der Informationsgewinn sich auf die Gesamtheit aller zirkulierenden Tumorzellen bezieht. Es kann jedoch keine Aussage hinsichtlich unterschiedlicher Genexpressionsmuster für einzelne zirkulierende Zellen getroffen werden. Nichtsdestotrotz vermag es die Real Time-Polymerase-Kettenreaktion, in der Erfassung erhöhter Genexpressionswerte biologischer Marker für die gesamte Probe aufzuzeigen, dass eine entsprechende Ausprägung und damit Charakteristik innerhalb der systemischen Erkrankung vorliegt, was Erkenntnisgewinn im Vergleich zur alleinigen histopathologischen Untersuchung des Primärtumormaterials ergeben mag und sodann nicht zuletzt in therapeutischen Konsequenzen resultieren kann.

Dass im untersuchten Patientenkollektiv dieser Arbeit die mittleren Genexpressionswerte für die Gruppe der adjuvanten Brustkrebspatientinnen gegenüber den gemittelten Werten der Kontrollgruppe ein Vielfaches betragen, zeigt dabei die Validität und Bedeutung der untersuchten Marker für die Krankheitsentität Mammakarzinom per se.

Allerdings ist für den einzelnen Krankheitsfall interessant, dass Konkordanzen wie auch Widersprüchlichkeiten auftreten, was in Anbetracht der zugrundeliegenden biologischen Phänomene nicht unerwartet erscheint. Dies zeigt sich unter anderem am Beispiel des Proliferationsmarkers Ki-67, bei dem einerseits für Patientinnen in der peripheren Blutprobe konkordant zur Expressierung am Primärtumormaterial eine erhöhte Genexpression nachzuweisen ist und andererseits bei weiteren Patientinnen trotz Nachweis für den Primarius eine Niederregulation in der Polymerase-Kettenreaktion festzustellen ist. Ähnliches fällt auf, wenn der Primarius der Patientin eine hohe Hormonrezeptorpositivität zeigt, dies aber nicht analog für zirkulierende Tumorzellen in der Real Time-Polymerase-Kettenreaktion nachvollzogen werden kann. Für triple-negative Patientinnen innerhalb des Kollektivs ist wiederum eine moderate Erhöhung der Genexpression des Östrogenrezeptors festzustellen. Gleichsam verhält es sich mit Her2-negativen Primärtumoren, bei denen die Analyse des Patientinnenbluts eine teils deutliche Hochregulation für Her2 zeigt.

Beachtenswert ist auch der Anstieg in der Genexpression für Cathepsin L2 bei vier Patientinnen – besonders vor dem Hintergrund, dass dieser Real Time-Polymerase-Kettenreaktion-Marker, der im hier angewendeten Modellsystem positiv evaluiert werden konnte, bislang weniger extensiv untersucht wurde.

Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung machen deutlich, dass durch erhöhte Genexprimierung das Vorliegen zirkulierender Tumorzellen mittels der Real Time-Polymerase-Kettenreaktion detektiert werden kann. Davon ausgehend auf spezifische Charakteristika der Tumorerkrankung zu schließen, stellt sich allerdings derzeit als schwierig heraus. Um dies zu ermöglichen, bedarf es größerer Patientenkollektive und eine Ausweitung des Genmarkerpanels, damit höhere statistische Signifikanz und Sensitivität erreicht werden können.

4.5 Her2-Switch

Um die bemerkenswerte klinische Relevanz zirkulierender Tumorzellen zu unterstreichen, lohnt die Betrachtung des Her2-Status. Mehrere Studien konnten bislang zeigen, dass eine Diskordanz in der Ausprägung des epidermalen Wachstumsfaktors 2 in zirkulierenden Zellen respektive metastatischen Zellverbänden im Vergleich zum Primärtumor vorliegen kann und auch Veränderungen des Her2-Status während des Krankheitsverlaufs möglich sind, was auch die Prognose der Patientinnen beeinflusst [229, 231, 253-260]. Durch die kontinuierliche Erfassung des Her2-Status zirkulierender Tumorzellen besteht folglich die Möglichkeit, prognostische wie prädiktive Informationen zu generieren und letztlich dieses Wissen in therapeutische Entscheidungen einfließen zu lassen.

Das DETECT-Studiendesign macht sich dies zur Aufgabe, eine Evaluation therapeutischer Entscheidungen auf Grundlage zirkulierender Tumorzellen bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom in der palliativen Situation zu liefern und dabei einen endokrinen Responsiveness-Score zu entwickeln [257]. Neben dem Her2-spezifischen monoklonalen Antikörper Trastuzumab, dessen Ansprechrate auf weniger als 50% der Patientinnen mit Her2-positivem Primarius geschätzt wird, finden neuere Her2-Blocker wie Lapatinib und Pertuzumab zunehmend in Addition zu Trastuzumab Verwendung, die in ihrem Einsatz im Rahmen dieses Studienprogramms erneut untersucht werden sollen [1, 257, 261-263]. Die Studie wird 2000 Patientinnen mit Her2-negativem Primarius screenen, um diese je nach Her2-Status ihrer zirkulierenden Tumorzellen verschiedenen Therapiepfaden in die DETECT III- beziehungsweise IV-Studie zuzuweisen; Patientinnen ohne detektierbare zirkulierende Tumorzellen werden ausgeschlossen [257]. In den dritten Studienarm, die DETECT V-Studie, sollen 270 Patientinnen eingeschlossen werden, die an einem Her2-positiven Primärtumor erkrankt sind und hinsichtlich ihrer Therapie randomisiert werden; vor und während der jeweiligen Therapie findet ein Monitoring der zirkulierenden Tumorzellen statt, um deren Verhalten unter Therapie zu verfolgen [257].

Es stellt sich heraus, dass der Her2-Status-Unterschied zwischen Primarius und Tumorabsiedlung sowohl statisch sein als auch einen dynamischen Prozess darstellen kann, weshalb zirkulierende Tumorzellen einen vielversprechenden Zugang erlauben, diesen Prozess nachzuvollziehen. Gerade

angesichts der Bedeutung, die von der Expression von Her2 für die Brustkrebserkrankung ausgeht, stellt dies eine wesentliche Stellschraube für die Entwicklung einer individualisierten Therapie für die Patientinnen dar.

5 Resümee

Der aktuelle Stand der Forschung zeigt, dass zirkulierende Tumorzellen beim Mammakarzinom mittels verschiedener Verfahren detektiert werden können, wobei die Real Time-Polymerase-Kettenreaktion eine sehr sensitive Methode darstellt und gleichzeitig das Potential in sich trägt, eine nähere Beschreibung und somit Charakterisierung der damit einhergehenden minimalen Resterkrankung zu ermöglichen. Damit dies gelingt, ist die Evaluierung und Erprobung weiterer Marker für diese Methode vonnöten, sodass auch Herausforderungen wie der Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition oder tumorale Heterogenität abgebildet werden können.

Sodann weisen zirkulierende Tumorzellen die Eignung auf, prognostische Aussagekraft für das Krankheitsgeschehen der Brustkrebspatientinnen darzustellen, indem ihr Vorhandensein krankheitsfreies Überleben sowie Gesamtüberleben beeinflusst. Zudem können sie als prädiktiver Indikator die Wirksamkeit von Therapien voraussagen und den Therapieerfolg im Behandlungsverlauf sicherstellen. Dabei erweist sich die leichte Zugänglichkeit, nämlich eine Blutprobe zu gewinnen, als großer Vorteil dieses diagnostischen Instruments.

Dadurch, dass dieses diagnostische Vorgehen ermöglicht wird, und molekularbiologische Vorgänge wie Metastasierung und Malignität besser verstanden werden, eröffnet es sich, Patientinnen eine dem Krankheitsverlauf sowie der Krankheit selbst angepasste und somit individuelle Therapie anzubieten.

Der gewaltige Erkenntnisfortschritt, neben der Erfassung der Biologie des Primarius und dessen Eigenschaften, das Wesen der minimalen Resterkrankung genauer fassen zu können, und somit mehr und mehr die Prozesse malignen Wachstums und der zugrundeliegenden Signalwege in all ihrer Komplexität nachzuvollziehen, bietet Ansatzpunkte für die Entwicklung zielgerichteter Therapien.

Auf diese Weise kann es gelingen, ein noch umfassenderes und dabei maßgeschneidertes Behandlungskonzept herauszuarbeiten, um somit Krankheitsprogression und -rezidiv einzudämmen und nach Möglichkeit zu unterbinden und damit das Langzeitüberleben wie auch die Lebensqualität der Patientinnen zu verbessern und zu sichern.

6 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste Tumorentität der Frau. Weltweit waren im Jahr 2012 annähernd 1,7 Millionen Frauen neu erkrankt, mehr als eine halbe Million Todesfälle waren allein für dieses Jahr zu beklagen. In Deutschland erkrankten im Jahr 2013 mehr als 70.000 Frauen an Brustkrebs, wobei etwa 18.000 Frauen an ihr verstarben. Für die folgenden Jahre wird eine Zunahme der Inzidenz prognostiziert.

Im Rahmen einer minimalen Resterkrankung ist bekannt, dass Tumorzellen ausgehend vom Primarius über periphere Blut- und Lymphbahnen streuen und ins Knochenmark absiedeln können. Von diesen disseminierten und zirkulierenden Tumorzellen kann wiederum Malignität in der Gestalt von Tumorprogression, Metastasierung und Krankheitsrezidiv ausgehen. Dabei können sich diese Zellen in Geno- wie Phänotyp voneinander unterscheiden und im Krankheitsverlauf verändern.

Aus diesem Grund ist es von besonderem Interesse, zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut von Brustkrebspatientinnen detektieren und ihnen Eigenschaften zuschreiben zu können, um ein verbessertes Krankheitsverstehen zu ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit untersuchte daher in einem Modellsystem die potentiellen Markergene Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, Her2, Ki-67, Cathepsin L2 und Bcl2 an Blutproben gesunder Spenderinnen, die mit einer vordefinierten Anzahl zellkulturtechnisch gewonnener CAMA-1-Brustkrebszellen versetzt und mittels der Real Time-Polymerase-Kettenreaktion hinsichtlich ihrer relativen Quantifizierung analysiert wurden, um auf diese Weise einen Nachweis für zirkulierende Tumorzellen erbringen und sich einer Charakterisierung annähern zu können.

Nach positiver Evaluation der Marker Östrogenrezeptor, Her2, Ki-67 und Cathepsin L2 wurden diese an 20 adjuvanten Brustkrebspatientinnen gegenüber einer negativen Kontrollgruppe untersucht. Es zeigte sich, dass das Mittel der Genexpressionswerte der Patientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe jeweils um ein Vielfaches erhöht ist.

Bei der Betrachtung der relativen Quantifizierungswerte der untersuchten Gene in den Patientenproben ergaben sich in Zusammenschau mit klinischen Daten und den biologischen Charakteristika des jeweiligen Primarius keine statistisch signifikanten Korrelationen.

Es zeigte sich jedoch einerseits, dass Übereinstimmungen zwischen biologischen Merkmalen des Primärtumors und Genexpressionswerten im Blut zirkulierender Tumorzellen gefunden werden konnten. Dies wird beispielsweise am Östrogenrezeptor-Status oder Ki-67-Nachweis ersichtlich. Andererseits ergaben sich auch Diskrepanzen zwischen ursprünglicher Tumorbiologie und der mittels

der Polymerase-Kettenreaktion ermittelten Genexpression zirkulierender Tumorzellen, was gerade im Hinblick auf intratumorale Heterogenität beachtenswert ist. Neben Diskonkordanzen obiger Charakteristika in einzelnen Patientenkonstellationen sind hierbei besonders die Ausprägung erhöhter Genexpressionswerte im Blut von Patientinnen mit triple-negativem Mammakarzinom sowie Ungleichmäßigkeiten hinsichtlich des Her2-Status anzumerken.

Es wurde offenbar, dass Auffälligkeiten in der Biologie der minimalen Resterkrankung festgestellt werden konnten, die beispielsweise im Phänomen des Her2-Switches eine therapeutische Konsequenz nach sich ziehen können. Auch wenn der Primärtumor Her2-negativ ist, mag bei Vorhandensein Her2-positiver zirkulierender Tumorzellen eine Her2-gerichtete Therapie sinnvoll erscheinen, um die systemische Erkrankung Brustkrebs umfassend zu behandeln. Weitere Forschungsbemühungen müssen hierfür zeigen, ob auf diese Weise die Prognose der Patientinnen verbessert werden kann.

Die Ergebnisse führen vor Augen, dass die Real Time-Polymerase-Kettenreaktion die methodische Eignung aufweist, zirkulierende Tumorzellen zu detektieren und zu charakterisieren. Sie kann dadurch auf biologische Besonderheiten der Krebserkrankung hinweisen. Die Analyse anhand eines größeren Patientenkollektivs und erweiterten Genmarkerpanels gepaart mit etablierten Detektionsmethoden stellt das Fundament dar, um umfassendere Erkenntnisse über die minimale Resterkrankung zu gewinnen.

7 Abkürzungsverzeichnis

Bcl2	B-cell lymphoma 2
BI-RADS	Breast Imaging Reporting And Data System
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ct	cycle treshold
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ER	Östrogenrezeptor
FCS	fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Her2	Human epidermal growth factor receptor 2
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	Luteinisierendes Hormon-Releasing-Hormon
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PR	Progesteronrezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RQ	Relative Quantifizierung
RT	Real-Time
WHO	World Health Organization

8 Literaturverzeichnis

1. Tachtsidis, A., L.M. McInnes, N. Jacobsen, E.W. Thompson, and C.M. Saunders, *Minimal residual disease in breast cancer: an overview of circulating and disseminated tumour cells*. Clin Exp Metastasis, 2016. **33**(6): p. 521-50.
2. VanGuilder, H.D., K.E. Vrana, and W.M. Freeman, *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis*. Biotechniques, 2008. **44**(5): p. 619-26.
3. Garibyan, L. and N. Avashia, *Polymerase chain reaction*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(3): p. e6.
4. Valasek, M.A. and J.J. Repa, *The power of real-time PCR*. Adv Physiol Educ, 2005. **29**(3): p. 151-9.
5. Kölbl, A.C., U. Jeschke, and U. Andergassen, *The Significance of Epithelial-to-Mesenchymal Transition for Circulating Tumor Cells*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(8).
6. Torre, L.A., F. Bray, R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal, *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
7. Miller, K.D., R.L. Siegel, C.C. Lin, A.B. Mariotto, J.L. Kramer, J.H. Rowland, K.D. Stein, R. Alteri, and A. Jemal, *Cancer treatment and survivorship statistics, 2016*. CA Cancer J Clin, 2016. **66**(4): p. 271-89.
8. *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 2016: Berlin.
9. *Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies*. Lancet Oncol, 2012. **13**(11): p. 1141-51.
10. Turkoz, F.P., M. Solak, I. Petekkaya, O. Keskin, N. Kertmen, F. Sarici, Z. Arik, T. Babacan, Y. Ozisik, and K. Altundag, *Association between common risk factors and molecular subtypes in breast cancer patients*. Breast, 2013. **22**(3): p. 344-50.
11. Lord, S.J., L. Bernstein, K.A. Johnson, K.E. Malone, J.A. McDonald, P.A. Marchbanks, M.S. Simon, B.L. Strom, M.F. Press, S.G. Folger, R.T. Burkman, D. Deapen, R. Spirtas, and G. Ursin, *Breast cancer risk and hormone receptor status in older women by parity, age of first birth, and breastfeeding: a case-control study*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(7): p. 1723-30.
12. Newcomb, P.A., A. Trentham-Dietz, J.M. Hampton, K.M. Egan, L. Titus-Ernstoff, S. Warren Andersen, E.R. Greenberg, and W.C. Willett, *Late age at first full term birth is strongly associated with lobular breast cancer*. Cancer, 2011. **117**(9): p. 1946-56.
13. Zhou, Y., J. Chen, Q. Li, W. Huang, H. Lan, and H. Jiang, *Association between breastfeeding and breast cancer risk: evidence from a meta-analysis*. Breastfeed Med, 2015. **10**(3): p. 175-82.
14. Neuhouwer, M.L., A.K. Aragaki, R.L. Prentice, J.E. Manson, R. Chlebowski, C.L. Carty, H.M. Ochs-Balcom, C.A. Thomson, B.J. Caan, L.F. Tinker, R.P. Urrutia, J. Knudtson, and G.L. Anderson, *Overweight, Obesity, and Postmenopausal Invasive Breast Cancer Risk: A Secondary Analysis of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials*. JAMA Oncol, 2015. **1**(5): p. 611-21.
15. Wang, X., E.R. Simpson, and K.A. Brown, *Aromatase overexpression in dysfunctional adipose tissue links obesity to postmenopausal breast cancer*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2015. **153**: p. 35-44.
16. Brooks, J.D., E.M. John, L. Mellekjær, C.F. Lynch, J.A. Knight, K.E. Malone, A.S. Reiner, L. Bernstein, X. Liang, R.E. Shore, M. Stovall, and J.L. Bernstein, *Body mass index, weight*

- change, and risk of second primary breast cancer in the WECARE study: influence of estrogen receptor status of the first breast cancer.* Cancer Med, 2016. **5**(11): p. 3282-3291.
17. Marchbanks, P.A., K.M. Curtis, M.G. Mandel, H.G. Wilson, G. Jeng, S.G. Folger, J.A. McDonald, J.R. Daling, L. Bernstein, K.E. Malone, P.A. Wingo, M.S. Simon, S.A. Norman, B.L. Strom, G. Ursin, L.K. Weiss, R.T. Burkman, and R. Spirtas, *Oral contraceptive formulation and risk of breast cancer.* Contraception, 2012. **85**(4): p. 342-50.
 18. Ritte, R., A. Lukanova, F. Berrino, L. Dossus, A. Tjonneland, A. Olsen, T.F. Overvad, K. Overvad, F. Clavel-Chapelon, A. Fournier, G. Fagherazzi, S. Rohrmann, B. Teucher, H. Boeing, K. Aleksandrova, A. Trichopoulou, P. Lagiou, D. Trichopoulos, D. Palli, S. Sieri, S. Panico, R. Tumino, P. Vineis, J.R. Quiros, G. Buckland, M.J. Sanchez, P. Amiano, M.D. Chirlaque, E. Ardanaz, M. Sund, P. Lenner, B. Bueno-de-Mesquita, C.H. van Gils, P.H. Peeters, S. Krum-Hansen, I.T. Gram, E. Lund, K.T. Khaw, N. Wareham, N.E. Allen, T.J. Key, I. Romieu, S. Rinaldi, A. Siddiq, D. Cox, E. Riboli, and R. Kaaks, *Adiposity, hormone replacement therapy use and breast cancer risk by age and hormone receptor status: a large prospective cohort study.* Breast Cancer Res, 2012. **14**(3): p. R76.
 19. *Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer.* Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Lancet, 1997. **350**(9084): p. 1047-59.
 20. Kawai, M., K.E. Malone, M.T. Tang, and C.I. Li, *Active smoking and the risk of estrogen receptor-positive and triple-negative breast cancer among women ages 20 to 44 years.* Cancer, 2014. **120**(7): p. 1026-34.
 21. Butler, E.N., C.K. Tse, M.E. Bell, K. Conway, A.F. Olshan, and M.A. Troester, *Active smoking and risk of Luminal and Basal-like breast cancer subtypes in the Carolina Breast Cancer Study.* Cancer Causes Control, 2016. **27**(6): p. 775-86.
 22. Trinh, T., S.E. Christensen, J.S. Brand, J. Cuzick, K. Czene, A. Sjolander, K. Balter, and P. Hall, *Background risk of breast cancer influences the association between alcohol consumption and mammographic density.* Br J Cancer, 2015. **113**(1): p. 159-65.
 23. Chlebowski, R.T., *Nutrition and physical activity influence on breast cancer incidence and outcome.* Breast, 2013. **22 Suppl 2**: p. S30-7.
 24. Pizot, C., M. Boniol, P. Mullie, A. Koechlin, M. Boniol, P. Boyle, and P. Autier, *Physical activity, hormone replacement therapy and breast cancer risk: A meta-analysis of prospective studies.* Eur J Cancer, 2016. **52**: p. 138-54.
 25. Trinh, T., M. Eriksson, H. Darabi, S.E. Bonn, J.S. Brand, J. Cuzick, K. Czene, A. Sjolander, K. Balter, and P. Hall, *Background risk of breast cancer and the association between physical activity and mammographic density.* Breast Cancer Res, 2015. **17**: p. 50.
 26. Boyd, N.F., G.A. Lockwood, L.J. Martin, J.A. Knight, J.W. Byng, M.J. Yaffe, and D.L. Tritchler, *Mammographic densities and breast cancer risk.* Breast Dis, 1998. **10**(3-4): p. 113-26.
 27. Pike, M.C. and C.L. Pearce, *Mammographic density, MRI background parenchymal enhancement and breast cancer risk.* Ann Oncol, 2013. **24 Suppl 8**: p. viii37-viii41.
 28. Inoue-Choi, M., R. Sinha, G.L. Gierach, and M.H. Ward, *Red and processed meat, nitrite, and heme iron intakes and postmenopausal breast cancer risk in the NIH-AARP Diet and Health Study.* Int J Cancer, 2016. **138**(7): p. 1609-18.
 29. Nelson, E.R., S.E. Wardell, J.S. Jasper, S. Park, S. Suchindran, M.K. Howe, N.J. Carver, R.V. Pillai, P.M. Sullivan, V. Sondhi, M. Umetani, J. Geradts, and D.P. McDonnell, *27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology.* Science, 2013. **342**(6162): p. 1094-8.

30. Toledo, E., J. Salas-Salvado, C. Donat-Vargas, P. Buil-Cosiales, R. Estruch, E. Ros, D. Corella, M. Fito, F.B. Hu, F. Aros, E. Gomez-Gracia, D. Romaguera, M. Ortega-Calvo, L. Serra-Majem, X. Pinto, H. Schroder, J. Basora, J.V. Sorli, M. Bullo, M. Serra-Mir, and M.A. Martinez-Gonzalez, *Mediterranean Diet and Invasive Breast Cancer Risk Among Women at High Cardiovascular Risk in the PREDIMED Trial: A Randomized Clinical Trial*. JAMA Intern Med, 2015. **175**(11): p. 1752-60.
31. Lacroix, M. and G. Leclercq, *The "portrait" of hereditary breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2005. **89**(3): p. 297-304.
32. Hall, J.M., M.K. Lee, B. Newman, J.E. Morrow, L.A. Anderson, B. Huey, and M.C. King, *Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21*. Science, 1990. **250**(4988): p. 1684-9.
33. Wooster, R., S.L. Neuhausen, J. Mangion, Y. Quirk, D. Ford, N. Collins, K. Nguyen, S. Seal, T. Tran, D. Averill, and et al., *Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13*. Science, 1994. **265**(5181): p. 2088-90.
34. Goldberg, J.I. and P.I. Borgen, *Breast cancer susceptibility testing: past, present and future*. Expert Rev Anticancer Ther, 2006. **6**(8): p. 1205-14.
35. Antoniou, A., P.D. Pharoah, S. Narod, H.A. Risch, J.E. Eyfjord, J.L. Hopper, N. Loman, H. Olsson, O. Johannsson, A. Borg, B. Pasini, P. Radice, S. Manoukian, D.M. Eccles, N. Tang, E. Olah, H. Anton-Culver, E. Warner, J. Lubinski, J. Gronwald, B. Gorski, H. Tulinius, S. Thorlacius, H. Eerola, H. Nevanlinna, K. Syrjakoski, O.P. Kallioniemi, D. Thompson, C. Evans, J. Peto, F. Laloo, D.G. Evans, and D.F. Easton, *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(5): p. 1117-30.
36. Meindl, A., H. Hellebrand, C. Wiek, V. Erven, B. Wappenschmidt, D. Niederacher, M. Freund, P. Lichtner, L. Hartmann, H. Schaal, J. Ramser, E. Honisch, C. Kubisch, H.E. Wichmann, K. Kast, H. Deissler, C. Engel, B. Muller-Myhsok, K. Neveling, M. Kiechle, C.G. Mathew, D. Schindler, R.K. Schmutzler, and H. Hanenberg, *Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene*. Nat Genet, 2010. **42**(5): p. 410-4.
37. Ricceri, F., F. Fasanelli, M.T. Giraudo, S. Sieri, R. Tumino, A. Mattiello, L. Vagliano, G. Masala, J.R. Quiros, N. Travier, M.J. Sanchez, N. Larranaga, M.D. Chirlaque, E. Ardanaz, A. Tjonneland, A. Olsen, K. Overvad, J. Chang-Claude, R. Kaaks, H. Boeing, F. Clavel-Chapelon, M. Kvaskoff, L. Dossus, A. Trichopoulou, V. Benetou, G. Adarakis, H.B. Bueno-de-Mesquita, P.H. Peeters, M. Sund, A. Andersson, S. Borgquist, S. Butt, E. Weiderpass, G. Skeie, K.T. Khaw, R.C. Travis, S. Rinaldi, I. Romieu, M. Gunter, M. Kadi, E. Riboli, P. Vineis, and C. Sacerdote, *Risk of second primary malignancies in women with breast cancer: Results from the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)*. Int J Cancer, 2015. **137**(4): p. 940-8.
38. Lebeau, A., M. Kriegsmann, E. Burandt, and H.P. Sinn, *[Invasive breast cancer: the current WHO classification]*. Pathologe, 2014. **35**(1): p. 7-17.
39. Lakhani S., E.I.O., Schnitt S.J., van de Vijver M.J., *WHO Classification of Tumours of the Breast*. 4 ed. IARC WHO Classification of Tumours. 2012, Lyon: International Agency for Research on Cancer.
40. Robertson, F.M., M. Bondy, W. Yang, H. Yamauchi, S. Wiggins, S. Kamrudin, S. Krishnamurthy, H. Le-Petross, L. Bidaut, A.N. Player, S.H. Barsky, W.A. Woodward, T. Buchholz, A. Lucci, N.T. Ueno, and M. Cristofanilli, *Inflammatory breast cancer: the disease, the biology, the treatment*. CA Cancer J Clin, 2010. **60**(6): p. 351-75.
41. Lloyd, J. and A.M. Flanagan, *Mammary and extramammary Paget's disease*. J Clin Pathol, 2000. **53**(10): p. 742-9.

42. Simpson, P.T., T. Gale, L.G. Fulford, J.S. Reis-Filho, and S.R. Lakhani, *The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: pathology of atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma in situ*. Breast Cancer Res, 2003. **5**(5): p. 258-62.
43. Allred, D.C., *Ductal carcinoma in situ: terminology, classification, and natural history*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2010. **2010**(41): p. 134-8.
44. Visscher, D.W., M.H. Frost, L.C. Hartmann, R.D. Frank, R.A. Vierkant, A.E. McCullough, S.J. Winham, C.M. Vachon, K. Ghosh, K.R. Brandt, A.M. Farrell, Y. Tarabishy, T.J. Hieken, T.C. Haddad, R.A. Kraft, D.C. Radisky, and A.C. Degnim, *Clinicopathologic features of breast cancers that develop in women with previous benign breast disease*. Cancer, 2016. **122**(3): p. 378-85.
45. Tice, J.A., E.S. O'Meara, D.L. Weaver, C. Vachon, R. Ballard-Barbash, and K. Kerlikowske, *Benign breast disease, mammographic breast density, and the risk of breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(14): p. 1043-9.
46. Castells, X., L. Domingo, J.M. Corominas, I. Tora-Rocamora, M.J. Quintana, M. Bare, C. Vidal, C. Natal, M. Sanchez, F. Saladie, J. Ferrer, M. Vernet, S. Servitja, A. Rodriguez-Arana, M. Roman, J.A. Espinas, and M. Sala, *Breast cancer risk after diagnosis by screening mammography of nonproliferative or proliferative benign breast disease: a study from a population-based screening program*. Breast Cancer Res Treat, 2015. **149**(1): p. 237-44.
47. Elston, C.W., *Classification and grading of invasive breast carcinoma*. Verh Dtsch Ges Pathol, 2005. **89**: p. 35-44.
48. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. Histopathology, 1991. **19**(5): p. 403-10.
49. Dai, X., L. Xiang, T. Li, and Z. Bai, *Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes*. J Cancer, 2016. **7**(10): p. 1281-94.
50. Allred, D.C., J.M. Harvey, M. Berardo, and G.M. Clark, *Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis*. Mod Pathol, 1998. **11**(2): p. 155-68.
51. Dowsett, M., T.O. Nielsen, R. A'Hern, J. Bartlett, R.C. Coombes, J. Cuzick, M. Ellis, N.L. Henry, J.C. Hugh, T. Lively, L. McShane, S. Paik, F. Penault-Llorca, L. Prudkin, M. Regan, J. Salter, C. Sotiriou, I.E. Smith, G. Viale, J.A. Zujewski, and D.F. Hayes, *Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(22): p. 1656-64.
52. Veronese, S.M., M. Gambacorta, O. Gottardi, F. Scanzi, M. Ferrari, and P. Lampertico, *Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer*. Cancer, 1993. **71**(12): p. 3926-31.
53. Nishimura, R., T. Osako, Y. Okumura, M. Hayashi, Y. Toyozumi, and N. Arima, *Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer*. Exp Ther Med, 2010. **1**(5): p. 747-754.
54. Nishimura, R., T. Osako, Y. Nishiyama, R. Tashima, M. Nakano, M. Fujisue, Y. Toyozumi, and N. Arima, *Prognostic significance of Ki-67 index value at the primary breast tumor in recurrent breast cancer*. Mol Clin Oncol, 2014. **2**(6): p. 1062-1068.
55. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
56. Wittliff, J.L., *Steroid-hormone receptors in breast cancer*. Cancer, 1984. **53**(3 Suppl): p. 630-43.
57. McGuire, W.L., *Current status of estrogen receptors in human breast cancer*. Cancer, 1975. **36**(2): p. 638-44.

58. Lippman, M., G. Bolan, and K. Huff, *The effects of glucocorticoids and progesterone on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture*. Cancer Res, 1976. **36**(12): p. 4602-9.
59. Jensen, E.V. and V.C. Jordan, *The estrogen receptor: a model for molecular medicine*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(6): p. 1980-9.
60. Harvey, J.M., G.M. Clark, C.K. Osborne, and D.C. Allred, *Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer*. J Clin Oncol, 1999. **17**(5): p. 1474-81.
61. Spitale, A., P. Mazzola, D. Soldini, L. Mazzucchelli, and A. Bordoni, *Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland*. Ann Oncol, 2009. **20**(4): p. 628-35.
62. Remmele, W. and H.E. Stegner, *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]*. Pathologe, 1987. **8**(3): p. 138-40.
63. Slamon, D.J., G.M. Clark, S.G. Wong, W.J. Levin, A. Ullrich, and W.L. McGuire, *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
64. Ahmed, S., A. Sami, and J. Xiang, *HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer*. Breast Cancer, 2015. **22**(2): p. 101-16.
65. Wolff, A.C., M.E. Hammond, J.N. Schwartz, K.L. Hagerty, D.C. Allred, R.J. Cote, M. Dowsett, P.L. Fitzgibbons, W.M. Hanna, A. Langer, L.M. McShane, S. Paik, M.D. Pegram, E.A. Perez, M.F. Press, A. Rhodes, C. Sturgeon, S.E. Taube, R. Tubbs, G.H. Vance, M. van de Vijver, T.M. Wheeler, and D.F. Hayes, *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(1): p. 18-43.
66. Perou, C.M., T. Sorlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lonning, A.L. Borresen-Dale, P.O. Brown, and D. Botstein, *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
67. Prat, A., C. Fan, A. Fernandez, K.A. Hoadley, R. Martinello, M. Vidal, M. Viladot, E. Pineda, A. Arance, M. Munoz, L. Pare, M.C. Cheang, B. Adamo, and C.M. Perou, *Response and survival of breast cancer intrinsic subtypes following multi-agent neoadjuvant chemotherapy*. BMC Med, 2015. **13**: p. 303.
68. Prat, A., E. Pineda, B. Adamo, P. Galvan, A. Fernandez, L. Gaba, M. Diez, M. Viladot, A. Arance, and M. Munoz, *Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer*. Breast, 2015. **24 Suppl 2**: p. S26-35.
69. Hugh, J., J. Hanson, M.C. Cheang, T.O. Nielsen, C.M. Perou, C. Dumontet, J. Reed, M. Krajewska, I. Treilleux, M. Rupin, E. Magherini, J. Mackey, M. Martin, and C. Vogel, *Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial*. J Clin Oncol, 2009. **27**(8): p. 1168-76.
70. Cheang, M.C., S.K. Chia, D. Voduc, D. Gao, S. Leung, J. Snider, M. Watson, S. Davies, P.S. Bernard, J.S. Parker, C.M. Perou, M.J. Ellis, and T.O. Nielsen, *Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(10): p. 736-50.
71. Schnitt, S.J., *Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy*. Mod Pathol, 2010. **23 Suppl 2**: p. S60-4.

72. Badve, S., D.J. Dabbs, S.J. Schnitt, F.L. Baehner, T. Decker, V. Eusebi, S.B. Fox, S. Ichihara, J. Jacquemier, S.R. Lakhani, J. Palacios, E.A. Rakha, A.L. Richardson, F.C. Schmitt, P.H. Tan, G.M. Tse, B. Weigelt, I.O. Ellis, and J.S. Reis-Filho, *Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists*. Mod Pathol, 2011. **24**(2): p. 157-67.
73. Harbeck, N., K. Sotlar, R. Wuerstlein, and S. Doisneau-Sixou, *Molecular and protein markers for clinical decision making in breast cancer: today and tomorrow*. Cancer Treat Rev, 2014. **40**(3): p. 434-44.
74. Goldhirsch, A., W.C. Wood, A.S. Coates, R.D. Gelber, B. Thurlimann, and H.J. Senn, *Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011*. Ann Oncol, 2011. **22**(8): p. 1736-47.
75. Duffy, M.J., P.M. McGowan, N. Harbeck, C. Thomssen, and M. Schmitt, *uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies*. Breast Cancer Res, 2014. **16**(4): p. 428.
76. *TNM Classification of malignant tumours*. 7 ed. 2010, New York: UICC.
77. Saslow, D., J. Hannan, J. Osuch, M.H. Alciati, C. Baines, M. Barton, J.K. Bobo, C. Coleman, M. Dolan, G. Gaumer, D. Kopans, S. Kutner, D.S. Lane, H. Lawson, H. Meissner, C. Moorman, H. Pennypacker, P. Pierce, E. Sciandra, R. Smith, and R. Coates, *Clinical breast examination: practical recommendations for optimizing performance and reporting*. CA Cancer J Clin, 2004. **54**(6): p. 327-44.
78. Ma, I., A. Dueck, R. Gray, N. Wasif, M. Giurescu, R. Lorans, V. Pizzitola, and B. Pockaj, *Clinical and self breast examination remain important in the era of modern screening*. Ann Surg Oncol, 2012. **19**(5): p. 1484-90.
79. Ryerson, A.B., J. Miller, and C.R. Ehemann, *Reported breast symptoms in the National Breast and Cervical Cancer Early Detection Program*. Cancer Causes Control, 2015. **26**(5): p. 733-40.
80. Aiello, E.J., D.S. Buist, E. White, D. Seger, and S.H. Taplin, *Rate of breast cancer diagnoses among postmenopausal women with self-reported breast symptoms*. J Am Board Fam Pract, 2004. **17**(6): p. 408-15.
81. Wu, S., J. Zhou, Y. Ren, J. Sun, F. Li, Q. Lin, H. Lin, and Z. He, *Tumor location is a prognostic factor for survival of Chinese women with T1-2N0M0 breast cancer*. Int J Surg, 2014. **12**(5): p. 394-8.
82. Colleoni, M., D. Zahrieh, R.D. Gelber, S.B. Holmberg, J.E. Mattsson, C.M. Rudenstam, J. Lindtner, D. Erzen, R. Snyder, J. Collins, M.F. Fey, B. Thurlimann, D. Crivellari, E. Murray, C. Mendiola, O. Pagani, M. Castiglione-Gertsch, A.S. Coates, K. Price, and A. Goldhirsch, *Site of primary tumor has a prognostic role in operable breast cancer: the international breast cancer study group experience*. J Clin Oncol, 2005. **23**(7): p. 1390-400.
83. Bock, K., S. Heywang-Kobrunner, L. Regitz-Jedermann, G. Hecht, and V. Kaab-Sanyal, *[Mammography screening in Germany. Current results and future challenges]*. Radiologe, 2014. **54**(3): p. 205-10.
84. Provencher, L., J.C. Hogue, C. Desbiens, B. Poirier, E. Poirier, D. Boudreau, M. Joyal, C. Diorio, N. Duchesne, and J. Chiquette, *Is clinical breast examination important for breast cancer detection?* Curr Oncol, 2016. **23**(4): p. e332-9.
85. Schwab, F.D., D.J. Huang, S.M. Schmid, A. Schotzau, and U. Guth, *Self-detection and clinical breast examination: comparison of the two "classical" physical examination methods for the diagnosis of breast cancer*. Breast, 2015. **24**(1): p. 90-2.

86. Njor, S., L. Nystrom, S. Moss, E. Paci, M. Broeders, N. Segnan, and E. Lynge, *Breast cancer mortality in mammographic screening in Europe: a review of incidence-based mortality studies*. J Med Screen, 2012. **19 Suppl 1**: p. 33-41.
87. Tilanus-Linthorst, M.M., M. Kriege, C. Boetes, W.C. Hop, I.M. Obdeijn, J.C. Oosterwijk, H.L. Peterse, H.M. Zonderland, S. Meijer, A.M. Eggermont, H.J. de Koning, J.G. Klijn, and C.T. Brekelmans, *Hereditary breast cancer growth rates and its impact on screening policy*. Eur J Cancer, 2005. **41**(11): p. 1610-7.
88. Berg, W.A., Z. Zhang, D. Lehrer, R.A. Jong, E.D. Pisano, R.G. Barr, M. Bohm-Velez, M.C. Mahoney, W.P. Evans, 3rd, L.H. Larsen, M.J. Morton, E.B. Mendelson, D.M. Farria, J.B. Cormack, H.S. Marques, A. Adams, N.M. Yeh, and G. Gabrielli, *Detection of breast cancer with addition of annual screening ultrasound or a single screening MRI to mammography in women with elevated breast cancer risk*. Jama, 2012. **307**(13): p. 1394-404.
89. Berg, W.A., J.D. Blume, J.B. Cormack, E.B. Mendelson, D. Lehrer, M. Böhm-Vélez, E.D. Pisano, R.A. Jong, W.P. Evans, M.J. Morton, M.C. Mahoney, L.H. Larsen, R.G. Barr, D.M. Farria, H.S. Marques, and K. Boparai, *Combined Screening with Ultrasound and Mammography Compared to Mammography Alone in Women at Elevated Risk of Breast Cancer: Results of the First-Year Screen in ACRIN 6666*. Jama, 2008. **299**(18): p. 2151-63.
90. Allison, K.H., L.A. Abraham, D.L. Weaver, A.N. Tosteson, H.D. Nelson, T. Onega, B.M. Geller, K. Kerlikowske, P.A. Carney, L.E. Ichikawa, D.S. Buist, and J.G. Elmore, *Trends in breast biopsy pathology diagnoses among women undergoing mammography in the United States: a report from the Breast Cancer Surveillance Consortium*. Cancer, 2015. **121**(9): p. 1369-78.
91. Meunier, M. and K. Clough, *Fine needle aspiration cytology versus percutaneous biopsy of nonpalpable breast lesions*. Eur J Radiol, 2002. **42**(1): p. 10-6.
92. Perry, N.M., *Quality assurance in the diagnosis of breast disease*. EUSOMA Working Party. Eur J Cancer, 2001. **37**(2): p. 159-72.
93. Meattini, I., E. Giannotti, D. Abdulcadir, C. Saieva, A.M. Guerrieri, E. Vanzi, D. Scartoni, S. Cecchini, L.J. Sanchez, L. Orzalesi, D. Casella, S. Bianchi, L. Livi, and J. Nori, *The impact of method of biopsy on the incidence of breast cancer sentinel lymph node metastases*. Eur J Surg Oncol, 2014. **40**(3): p. 277-81.
94. Liikanen, J., M. Leidenius, H. Joensuu, J. Vironen, P. Heikkilä, and T. Meretoja, *Breast cancer prognosis and isolated tumor cell findings in axillary lymph nodes after core needle biopsy and fine needle aspiration cytology: Biopsy method and breast cancer outcome*. Eur J Surg Oncol, 2016. **42**(1): p. 64-70.
95. Gipponi, M., C. Bassetti, G. Canavese, A. Catturich, C. Di Somma, C. Vecchio, G. Nicolo, F. Schenone, D. Tomei, and F. Cafiero, *Sentinel lymph node as a new marker for therapeutic planning in breast cancer patients*. J Surg Oncol, 2004. **85**(3): p. 102-11.
96. Kuehn, T., F.D. Vogl, G. Helms, S.V. Pueckler, H. Schirrmeister, R. Strueber, K. Koretz, and R. Kreienberg, *Sentinel-node biopsy for axillary staging in breast cancer: results from a large prospective German multi-institutional trial*. Eur J Surg Oncol, 2004. **30**(3): p. 252-9.
97. National Collaborating Centre for Cancer, *National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance*, in *Early and Locally Advanced Breast Cancer: Diagnosis and Treatment*. 2009, National Collaborating Centre for Cancer, Cardiff (UK)
98. Lee, Y.T., *Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy*. J Surg Oncol, 1983. **23**(3): p. 175-80.
99. Veronesi, U., N. Cascinelli, L. Mariani, M. Greco, R. Saccozzi, A. Luini, M. Aguilar, and E. Marubini, *Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer*. N Engl J Med, 2002. **347**(16): p. 1227-32.

100. Fisher, B., S. Anderson, J. Bryant, R.G. Margolese, M. Deutsch, E.R. Fisher, J.H. Jeong, and N. Wolmark, *Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer*. N Engl J Med, 2002. **347**(16): p. 1233-41.
101. Galimberti, V., B.F. Cole, S. Zurrida, G. Viale, A. Luini, P. Veronesi, P. Baratella, C. Chifu, M. Sargenti, M. Intra, O. Gentilini, M.G. Mastropasqua, G. Mazzarol, S. Massarut, J.R. Garbay, J. Zgajnar, H. Galatius, A. Recalcati, D. Littlejohn, M. Bamert, M. Colleoni, K.N. Price, M.M. Regan, A. Goldhirsch, A.S. Coates, R.D. Gelber, and U. Veronesi, *Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2013. **14**(4): p. 297-305.
102. Krag, D., D. Weaver, T. Ashikaga, F. Moffat, V.S. Klimberg, C. Shriver, S. Feldman, R. Kusminsky, M. Gadd, J. Kuhn, S. Harlow, and P. Beitsch, *The sentinel node in breast cancer--a multicenter validation study*. N Engl J Med, 1998. **339**(14): p. 941-6.
103. Peintinger, F., R. Reitsamer, H. Stranzl, and G. Ralph, *Comparison of quality of life and arm complaints after axillary lymph node dissection vs sentinel lymph node biopsy in breast cancer patients*. Br J Cancer, 2003. **89**(4): p. 648-52.
104. Fisher, B., A. Brown, E. Mamounas, S. Wieand, A. Robidoux, R.G. Margolese, A.B. Cruz, Jr., E.R. Fisher, D.L. Wickerham, N. Wolmark, A. DeCillis, J.L. Hoehn, A.W. Lees, and N.V. Dimitrov, *Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18*. J Clin Oncol, 1997. **15**(7): p. 2483-93.
105. Kong, X., M.S. Moran, N. Zhang, B. Haffty, and Q. Yang, *Meta-analysis confirms achieving pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy predicts favourable prognosis for breast cancer patients*. Eur J Cancer, 2011. **47**(14): p. 2084-90.
106. Petrelli, F., K. Borgonovo, M. Cabiddu, M. Ghilardi, and S. Barni, *Neoadjuvant chemotherapy and concomitant trastuzumab in breast cancer: a pooled analysis of two randomized trials*. Anticancer Drugs, 2011. **22**(2): p. 128-35.
107. von Minckwitz, G., M. Untch, E. Nuesch, S. Loibl, M. Kaufmann, S. Kummel, P.A. Fasching, W. Eiermann, J.U. Blohmer, S.D. Costa, K. Mehta, J. Hilfrich, C. Jackisch, B. Gerber, A. du Bois, J. Huober, C. Hanusch, G. Konecny, W. Fett, E. Stickeler, N. Harbeck, V. Muller, and P. Juni, *Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes: pooled analysis of the German neo-adjuvant chemotherapy trials*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **125**(1): p. 145-56.
108. Kaufmann, M., G.N. Hortobagyi, A. Goldhirsch, S. Scholl, A. Makris, P. Valagussa, J.U. Blohmer, W. Eiermann, R. Jackesz, W. Jonat, A. Lebeau, S. Loibl, W. Miller, S. Seeber, V. Semiglazov, R. Smith, R. Souchon, V. Stearns, M. Untch, and G. von Minckwitz, *Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update*. J Clin Oncol, 2006. **24**(12): p. 1940-9.
109. Peto, R., C. Davies, J. Godwin, R. Gray, H.C. Pan, M. Clarke, D. Cutter, S. Darby, P. McGale, C. Taylor, Y.C. Wang, J. Bergh, A. Di Leo, K. Albain, S. Swain, M. Piccart, and K. Pritchard, *Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials*. Lancet, 2012. **379**(9814): p. 432-44.
110. Martin, M., A. Rodriguez-Lescure, A. Ruiz, E. Alba, L. Calvo, M. Ruiz-Borrego, B. Munarriz, C.A. Rodriguez, C. Crespo, E. de Alava, J.A. Lopez Garcia-Asenjo, M.D. Guitian, S. Almenar, J.F. Gonzalez-Palacios, F. Vera, J. Palacios, M. Ramos, J.M. Gracia Marco, A. Lluch, I. Alvarez, M.A. Segui, J.I. Mayordomo, A. Anton, J.M. Baena, A. Plazaola, A. Modolell, A. Pelegri, J.R. Mel, E. Aranda, E. Adrover, J.V. Alvarez, J.L. Garcia Puche, P. Sanchez-Rovira, S. Gonzalez, and J.M.

- Lopez-Vega, *Randomized phase 3 trial of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide alone or followed by Paclitaxel for early breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(11): p. 805-14.
111. Bonnetterre, J., H. Roche, P. Kerbrat, A. Bremond, P. Fumoleau, M. Namer, M.J. Goudier, S. Schraub, P. Fargeot, and I. Chapelle-Marcillac, *Epirubicin increases long-term survival in adjuvant chemotherapy of patients with poor-prognosis, node-positive, early breast cancer: 10-year follow-up results of the French Adjuvant Study Group 05 randomized trial*. J Clin Oncol, 2005. **23**(12): p. 2686-93.
 112. Carrick, S., S. Parker, N. Wilcken, D. Ghersi, M. Marzo, and J. Simes, *Single agent versus combination chemotherapy for metastatic breast cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(2): p. Cd003372.
 113. Fossati, R., C. Confalonieri, V. Torri, E. Ghislandi, A. Penna, V. Pistotti, A. Tinazzi, and A. Liberati, *Cytotoxic and hormonal treatment for metastatic breast cancer: a systematic review of published randomized trials involving 31,510 women*. J Clin Oncol, 1998. **16**(10): p. 3439-60.
 114. Piccart-Gebhart, M.J., T. Burzykowski, M. Buyse, G. Sledge, J. Carmichael, H.J. Luck, J.R. Mackey, J.M. Nabholz, R. Paridaens, L. Biganzoli, J. Jassem, M. Bontenbal, J. Bonnetterre, S. Chan, G.A. Basaran, and P. Therasse, *Taxanes alone or in combination with anthracyclines as first-line therapy of patients with metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(12): p. 1980-6.
 115. Romond, E.H., E.A. Perez, J. Bryant, V.J. Suman, C.E. Geyer, Jr., N.E. Davidson, E. Tan-Chiu, S. Martino, S. Paik, P.A. Kaufman, S.M. Swain, T.M. Pisansky, L. Fehrenbacher, L.A. Kutteh, V.G. Vogel, D.W. Visscher, G. Yothers, R.B. Jenkins, A.M. Brown, S.R. Dakhil, E.P. Mamounas, W.L. Lingle, P.M. Klein, J.N. Ingle, and N. Wolmark, *Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1673-84.
 116. Davies, C., J. Godwin, R. Gray, M. Clarke, D. Cutter, S. Darby, P. McGale, H.C. Pan, C. Taylor, Y.C. Wang, M. Dowsett, J. Ingle, and R. Peto, *Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials*. Lancet, 2011. **378**(9793): p. 771-84.
 117. van Leeuwen, F.E., J. Benraadt, J.W. Coebergh, L.A. Kiemeny, C.H. Gimbrere, R. Otter, L.J. Schouten, R.A. Damhuis, M. Bontenbal, F.W. Diepenhorst, and et al., *Risk of endometrial cancer after tamoxifen treatment of breast cancer*. Lancet, 1994. **343**(8895): p. 448-52.
 118. Bergman, L., M.L. Beelen, M.P. Gallee, H. Hollema, J. Benraadt, and F.E. van Leeuwen, *Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. Comprehensive Cancer Centres' ALERT Group. Assessment of Liver and Endometrial cancer Risk following Tamoxifen*. Lancet, 2000. **356**(9233): p. 881-7.
 119. Jones, M.E., F.E. van Leeuwen, W.E. Hoogendoorn, M.J. Mourits, H. Hollema, H. van Boven, M.F. Press, L. Bernstein, and A.J. Swerdlow, *Endometrial cancer survival after breast cancer in relation to tamoxifen treatment: pooled results from three countries*. Breast Cancer Res, 2012. **14**(3): p. R91.
 120. Klijn, J.G., R.W. Blamey, F. Boccardo, T. Tominaga, L. Duchateau, and R. Sylvester, *Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a meta-analysis of four randomized trials*. J Clin Oncol, 2001. **19**(2): p. 343-53.
 121. Cuzick, J., L. Ambrosine, N. Davidson, R. Jakesz, M. Kaufmann, M. Regan, and R. Sainsbury, *Use of luteinising-hormone-releasing hormone agonists as adjuvant treatment in premenopausal patients with hormone-receptor-positive breast cancer: a meta-analysis of individual patient data from randomised adjuvant trials*. Lancet, 2007. **369**(9574): p. 1711-23.

122. Burstein, H.J., C. Lacchetti, H. Anderson, T.A. Buchholz, N.E. Davidson, K.E. Gelmon, S.H. Giordano, C.A. Hudis, A.J. Solky, V. Stearns, E.P. Winer, and J.J. Griggs, *Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on Ovarian Suppression*. J Clin Oncol, 2016. **34**(14): p. 1689-701.
123. Jakesz, R., W. Jonat, M. Gnant, M. Mittlboeck, R. Greil, C. Tausch, J. Hilfrich, W. Kwasny, C. Menzel, H. Samonigg, M. Seifert, G. Gademann, M. Kaufmann, and J. Wolfgang, *Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial*. Lancet, 2005. **366**(9484): p. 455-62.
124. Hoskin, P.J., J.R. Yarnold, D.R. Roos, and S. Bentzen, *Radiotherapy for bone metastases*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2001. **13**(2): p. 88-90.
125. Sherar, M., F.F. Liu, M. Pintilie, W. Levin, J. Hunt, R. Hill, J. Hand, C. Vernon, G. van Rhoon, J. van der Zee, D.G. Gonzalez, J. van Dijk, J. Whaley, and D. Machin, *Relationship between thermal dose and outcome in thermoradiotherapy treatments for superficial recurrences of breast cancer: data from a phase III trial*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997. **39**(2): p. 371-80.
126. Jones, E.L., J.R. Oleson, L.R. Prosnitz, T.V. Samulski, Z. Vujaskovic, D. Yu, L.L. Sanders, and M.W. Dewhurst, *Randomized trial of hyperthermia and radiation for superficial tumors*. J Clin Oncol, 2005. **23**(13): p. 3079-85.
127. Darby, S., P. McGale, C. Correa, C. Taylor, R. Arriagada, M. Clarke, D. Cutter, C. Davies, M. Ewertz, J. Godwin, R. Gray, L. Pierce, T. Whelan, Y. Wang, and R. Peto, *Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials*. Lancet, 2011. **378**(9804): p. 1707-16.
128. Walsh, S.M., A.J. Lowery, R.S. Prichard, E.W. McDermott, D. Evoy, and J. Geraghty, *Postmastectomy radiotherapy: indications and implications*. Surgeon, 2014. **12**(6): p. 310-5.
129. Kondziolka, D., A. Patel, L.D. Lunsford, A. Kassam, and J.C. Flickinger, *Stereotactic radiosurgery plus whole brain radiotherapy versus radiotherapy alone for patients with multiple brain metastases*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1999. **45**(2): p. 427-34.
130. Hart, M.G., R. Grant, M. Walker, and H. Dickinson, *Surgical resection and whole brain radiation therapy versus whole brain radiation therapy alone for single brain metastases*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(1): p. Cd003292.
131. Hoffmann, J. and D. Wallwiener, *Classifying breast cancer surgery: a novel, complexity-based system for oncological, oncoplastic and reconstructive procedures, and proof of principle by analysis of 1225 operations in 1166 patients*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 108.
132. Biazus, J.V., C.C. Falcao, A.C. Parizotto, C.C. Stumpf, J.A. Cavaleiro, F. Schuh, R. Cericatto, A.E. Zucatto, and M.P. Melo, *Immediate Reconstruction with Autologous fat Transfer Following Breast-Conserving Surgery*. Breast J, 2015. **21**(3): p. 268-75.
133. Zabalegui, A., S. Sanchez, P.D. Sanchez, and C. Juando, *Nursing and cancer support groups*. J Adv Nurs, 2005. **51**(4): p. 369-81.
134. McArdle, J.M., W.D. George, C.S. McArdle, D.C. Smith, A.R. Moodie, A.V. Hughson, and G.D. Murray, *Psychological support for patients undergoing breast cancer surgery: a randomised study*. Bmj, 1996. **312**(7034): p. 813-6.
135. Wildner, M., *[Diagnosis, prognosis, prediction]*. Gesundheitswesen, 2014. **76**(4): p. 185-6.
136. *Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer. Recommendations 2015.* 2015; Available from: <http://www.ago->

- online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/maerz2015/de/2015D_Alle_aktuellen_Empfehlungen.pdf.
137. Coates, A.S., E.P. Winer, A. Goldhirsch, R.D. Gelber, M. Gnant, M. Piccart-Gebhart, B. Thurlimann, and H.J. Senn, *Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015*. Ann Oncol, 2015. **26**(8): p. 1533-46.
 138. Friedl, P. and S. Alexander, *Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity*. Cell, 2011. **147**(5): p. 992-1009.
 139. Fidler, I.J., D.M. Gersten, and I.R. Hart, *The biology of cancer invasion and metastasis*. Adv Cancer Res, 1978. **28**: p. 149-250.
 140. Terranova, V.P., S. Hic, R.M. Diflorio, and R.M. Lyall, *Tumor cell metastasis*. Crit Rev Oncol Hematol, 1986. **5**(2): p. 87-114.
 141. Ashworth, T., *A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death*. Aust Med J, 1869. **14**(3): p. 146-149.
 142. Paget, S., *THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST*. The Lancet, 1889. **133**(3421): p. 571-573.
 143. Mego, M., S.A. Mani, and M. Cristofanilli, *Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications*. Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(12): p. 693-701.
 144. Fidler, I.J. and G. Poste, *The "seed and soil" hypothesis revisited*. Lancet Oncol, 2008. **9**(8): p. 808.
 145. Braun, S., F.D. Vogl, B. Naume, W. Janni, M.P. Osborne, R.C. Coombes, G. Schlimok, I.J. Diel, B. Gerber, G. Gebauer, J.Y. Pierga, C. Marth, D. Ouzio, G. Wiedswang, E.F. Solomayer, G. Kundt, B. Strobl, T. Fehm, G.Y. Wong, J. Bliss, A. Vincent-Salomon, and K. Pantel, *A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(8): p. 793-802.
 146. Kim, M.Y., T. Oskarsson, S. Acharyya, D.X. Nguyen, X.H. Zhang, L. Norton, and J. Massague, *Tumor self-seeding by circulating cancer cells*. Cell, 2009. **139**(7): p. 1315-26.
 147. Comen, E., L. Norton, and J. Massague, *Clinical implications of cancer self-seeding*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. **8**(6): p. 369-77.
 148. Aguirre-Ghiso, J.A., *On the theory of tumor self-seeding: implications for metastasis progression in humans*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(2): p. 304.
 149. Creighton, C.J., X. Li, M. Landis, J.M. Dixon, V.M. Neumeister, A. Sjolund, D.L. Rimm, H. Wong, A. Rodriguez, J.I. Herschkowitz, C. Fan, X. Zhang, X. He, A. Pavlick, M.C. Gutierrez, L. Renshaw, A.A. Larionov, D. Faratian, S.G. Hilsenbeck, C.M. Perou, M.T. Lewis, J.M. Rosen, and J.C. Chang, *Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(33): p. 13820-5.
 150. Li, X., M.T. Lewis, J. Huang, C. Gutierrez, C.K. Osborne, M.F. Wu, S.G. Hilsenbeck, A. Pavlick, X. Zhang, G.C. Chamness, H. Wong, J. Rosen, and J.C. Chang, *Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(9): p. 672-9.
 151. Lagadec, C., E. Vlashi, L. Della Donna, Y. Meng, C. Dekmezian, K. Kim, and F. Pajonk, *Survival and self-renewing capacity of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(1): p. R13.
 152. Fillmore, C.M. and C. Kuperwasser, *Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(2): p. R25.

153. Tomaskovic-Crook, E., E.W. Thompson, and J.P. Thiery, *Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(6): p. 213.
154. Savagner, P., *The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon*. Ann Oncol, 2010. **21 Suppl 7**: p. vii89-92.
155. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
156. Kalluri, R., *EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1417-9.
157. Chao, Y.L., C.R. Shepard, and A. Wells, *Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 179.
158. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 131-42.
159. Sarrio, D., S.M. Rodriguez-Pinilla, D. Hardisson, A. Cano, G. Moreno-Bueno, and J. Palacios, *Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype*. Cancer Res, 2008. **68**(4): p. 989-97.
160. Willipinski-Stapelfeldt, B., S. Riethdorf, V. Assmann, U. Woelfle, T. Rau, G. Sauter, J. Heukeshoven, and K. Pantel, *Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(22): p. 8006-14.
161. Aktas, B., M. Tewes, T. Fehm, S. Hauch, R. Kimmig, and S. Kasimir-Bauer, *Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(4): p. R46.
162. Wu, S., S. Liu, Z. Liu, J. Huang, X. Pu, J. Li, D. Yang, H. Deng, N. Yang, and J. Xu, *Classification of circulating tumor cells by epithelial-mesenchymal transition markers*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0123976.
163. Yu, M., A. Bardia, B.S. Wittner, S.L. Stott, M.E. Smas, D.T. Ting, S.J. Isakoff, J.C. Ciciliano, M.N. Wells, A.M. Shah, K.F. Concannon, M.C. Donaldson, L.V. Sequist, E. Brachtel, D. Sgroi, J. Baselga, S. Ramaswamy, M. Toner, D.A. Haber, and S. Maheswaran, *Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition*. Science, 2013. **339**(6119): p. 580-4.
164. Bidard, F.C., A. Vincent-Salomon, S. Gomme, C. Nos, Y. de Rycke, J.P. Thiery, B. Sigal-Zafrani, L. Mignot, X. Sastre-Garau, and J.Y. Pierga, *Disseminated tumor cells of breast cancer patients: a strong prognostic factor for distant and local relapse*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(11): p. 3306-11.
165. Husemann, Y., J.B. Geigl, F. Schubert, P. Musiani, M. Meyer, E. Burghart, G. Forni, R. Eils, T. Fehm, G. Riethmuller, and C.A. Klein, *Systemic spread is an early step in breast cancer*. Cancer Cell, 2008. **13**(1): p. 58-68.
166. Krishnamurthy, S., M. Cristofanilli, B. Singh, J. Reuben, H. Gao, E.N. Cohen, E. Andreopoulou, C.S. Hall, A. Lodhi, S. Jackson, and A. Lucci, *Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer*. Cancer, 2010. **116**(14): p. 3330-7.
167. Townson, J.L. and A.F. Chambers, *Dormancy of solitary metastatic cells*. Cell Cycle, 2006. **5**(16): p. 1744-50.
168. Paez, D., M.J. Labonte, P. Bohanes, W. Zhang, L. Benhanim, Y. Ning, T. Wakatsuki, F. Loupakis, and H.J. Lenz, *Cancer dormancy: a model of early dissemination and late cancer recurrence*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(3): p. 645-53.

169. Wikman, H., R. Vessella, and K. Pantel, *Cancer micrometastasis and tumour dormancy*. *Apmis*, 2008. **116**(7-8): p. 754-70.
170. Kuukasjarvi, T., R. Karhu, M. Tanner, M. Kahkonen, A. Schaffer, N. Nupponen, S. Pennanen, A. Kallioniemi, O.P. Kallioniemi, and J. Isola, *Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer*. *Cancer Res*, 1997. **57**(8): p. 1597-604.
171. Schmidt-Kittler, O., T. Ragg, A. Daskalakis, M. Granzow, A. Ahr, T.J. Blankenstein, M. Kaufmann, J. Diebold, H. Arnholdt, P. Muller, J. Bischoff, D. Harich, G. Schlimok, G. Riethmuller, R. Eils, and C.A. Klein, *From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(13): p. 7737-42.
172. Alix-Panabieres, C. and K. Pantel, *Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer*. *Clin Chem*, 2013. **59**(1): p. 110-8.
173. Schindlbeck, C., U. Andergassen, J. Jueckstock, B. Rack, W. Janni, and U. Jeschke, *Disseminated and circulating tumor cells in bone marrow and blood of breast cancer patients: properties, enrichment, and potential targets*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016. **142**(9): p. 1883-95.
174. Ghossein, R.A., S. Bhattacharya, and J. Rosai, *Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors*. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(8): p. 1950-60.
175. Sun, Y.F., X.R. Yang, J. Zhou, S.J. Qiu, J. Fan, and Y. Xu, *Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011. **137**(8): p. 1151-73.
176. Tibbe, A.G., M.C. Miller, and L.W. Terstappen, *Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells*. *Cytometry A*, 2007. **71**(3): p. 154-62.
177. Andree, K.C., G. van Dalum, and L.W. Terstappen, *Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system*. *Mol Oncol*, 2016. **10**(3): p. 395-407.
178. Lianidou, E.S. and A. Markou, *Circulating tumor cells as emerging tumor biomarkers in breast cancer*. *Clin Chem Lab Med*, 2011. **49**(10): p. 1579-90.
179. Hartkopf, A.D., M. Wallwiener, T.N. Fehm, M. Hahn, C.B. Walter, I. Gruber, S.Y. Brucker, and F.A. Taran, *Disseminated tumor cells from the bone marrow of patients with nonmetastatic primary breast cancer are predictive of locoregional relapse*. *Ann Oncol*, 2015. **26**(6): p. 1155-60.
180. Schindlbeck, C., G. Pfab, J. Jueckstock, U. Andergassen, H. Sommer, W. Janni, K. Friese, and B. Rack, *Prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer--results of a standardized follow-up*. *Anticancer Res*, 2011. **31**(9): p. 2749-55.
181. Cristofanilli, M., G.T. Budd, M.J. Ellis, A. Stopeck, J. Matera, M.C. Miller, J.M. Reuben, G.V. Doyle, W.J. Allard, L.W. Terstappen, and D.F. Hayes, *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(8): p. 781-91.
182. Lucci, A., C.S. Hall, A.K. Lodhi, A. Bhattacharyya, A.E. Anderson, L. Xiao, I. Bedrosian, H.M. Kuerer, and S. Krishnamurthy, *Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study*. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(7): p. 688-95.
183. Franken, B., M.R. de Groot, W.J. Mastboom, I. Vermes, J. van der Palen, A.G. Tibbe, and L.W. Terstappen, *Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2012. **14**(5): p. R133.
184. Rack, B., C. Schindlbeck, J. Jueckstock, U. Andergassen, P. Hepp, T. Zwingers, T.W. Friedl, R. Lorenz, H. Tesch, P.A. Fasching, T. Fehm, A. Schneeweiss, W. Lichtenegger, M.W. Beckmann,

- K. Friese, K. Pantel, and W. Janni, *Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients*. J Natl Cancer Inst, 2014. **106**(5).
185. Hartkopf, A.D., P. Wagner, D. Wallwiener, T. Fehm, and R. Rothmund, *Changing levels of circulating tumor cells in monitoring chemotherapy response in patients with metastatic breast cancer*. Anticancer Res, 2011. **31**(3): p. 979-84.
 186. Giuliano, M., A. Giordano, S. Jackson, K.R. Hess, U. De Giorgi, M. Mego, B.C. Handy, N.T. Ueno, R.H. Alvarez, M. De Laurentiis, S. De Placido, V. Valero, G.N. Hortobagyi, J.M. Reuben, and M. Cristofanilli, *Circulating tumor cells as prognostic and predictive markers in metastatic breast cancer patients receiving first-line systemic treatment*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(3): p. R67.
 187. Giuliano, M., A. Giordano, S. Jackson, U. De Giorgi, M. Mego, E.N. Cohen, H. Gao, S. Anfossi, B.C. Handy, N.T. Ueno, R.H. Alvarez, S. De Placido, V. Valero, G.N. Hortobagyi, J.M. Reuben, and M. Cristofanilli, *Circulating tumor cells as early predictors of metastatic spread in breast cancer patients with limited metastatic dissemination*. Breast Cancer Res, 2014. **16**(5): p. 440.
 188. Liu, M.C., P.G. Shields, R.D. Warren, P. Cohen, M. Wilkinson, Y.L. Ottaviano, S.B. Rao, J. Eng-Wong, F. Seillier-Moisewitsch, A.M. Noone, and C. Isaacs, *Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(31): p. 5153-9.
 189. Budd, G.T., M. Cristofanilli, M.J. Ellis, A. Stopeck, E. Borden, M.C. Miller, J. Matera, M. Repollet, G.V. Doyle, L.W. Terstappen, and D.F. Hayes, *Circulating tumor cells versus imaging-predicting overall survival in metastatic breast cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(21): p. 6403-9.
 190. Datta, Y.H., P.T. Adams, W.R. Drobyski, S.P. Ethier, V.H. Terry, and M.S. Roth, *Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction*. J Clin Oncol, 1994. **12**(3): p. 475-82.
 191. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol, 1987. **155**: p. 335-50.
 192. Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich, *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
 193. Raj, G.V., J.G. Moreno, and L.G. Gomella, *Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors*. Cancer, 1998. **82**(8): p. 1419-42.
 194. Ghossein, R.A. and J. Rosai, *Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells*. Cancer, 1996. **78**(1): p. 10-6.
 195. Zach, O., H. Kasparu, O. Krieger, W. Hehenwarter, M. Girschikofsky, and D. Lutz, *Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA*. J Clin Oncol, 1999. **17**(7): p. 2015-9.
 196. Lankiewicz, S., B.G. Rivero, and O. Bocher, *Quantitative real-time RT-PCR of disseminated tumor cells in combination with immunomagnetic cell enrichment*. Mol Biotechnol, 2006. **34**(1): p. 15-27.
 197. Van der Auwera, I., D. Peeters, I.H. Benoy, H.J. Elst, S.J. Van Laere, A. Prove, H. Maes, P. Huget, P. van Dam, P.B. Vermeulen, and L.Y. Dirix, *Circulating tumour cell detection: a direct comparison between the CellSearch System, the AdnaTest and CK-19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer*. Br J Cancer, 2010. **102**(2): p. 276-84.
 198. Andreopoulou, E., L.Y. Yang, K.M. Rangel, J.M. Reuben, L. Hsu, S. Krishnamurthy, V. Valero, H.A. Fritsche, and M. Cristofanilli, *Comparison of assay methods for detection of circulating*

- tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect versus Veridex CellSearch system. *Int J Cancer*, 2012. **130**(7): p. 1590-7.
199. Wang, H.Y., S. Ahn, S. Kim, S. Park, S. Park, H. Han, J.H. Sohn, S. Kim, and H. Lee, *Detection of circulating tumor cells in patients with breast cancer using the quantitative RT-PCR assay for monitoring of therapy efficacy*. *Exp Mol Pathol*, 2014. **97**(3): p. 445-52.
 200. Andergassen, U., A.C. Kolbl, S. Mahner, and U. Jeschke, *Real-time RT-PCR systems for CTC detection from blood samples of breast cancer and gynaecological tumour patients (Review)*. *Oncol Rep*, 2016. **35**(4): p. 1905-15.
 201. Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak, and P.M. Williams, *Real time quantitative PCR*. *Genome Res*, 1996. **6**(10): p. 986-94.
 202. Kubista, M., J.M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonak, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjoberg, B. Sjogreen, L. Strombom, A. Stahlberg, and N. Zoric, *The real-time polymerase chain reaction*. *Mol Aspects Med*, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
 203. Holland, P.M., R.D. Abramson, R. Watson, and D.H. Gelfand, *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(16): p. 7276-80.
 204. Livak, K.J., S.J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, and K. Deetz, *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization*. *PCR Methods Appl*, 1995. **4**(6): p. 357-62.
 205. Didenko, V.V., *DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications*. *Biotechniques*, 2001. **31**(5): p. 1106-16, 1118, 1120-1.
 206. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. *J Mol Endocrinol*, 2000. **25**(2): p. 169-93.
 207. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
 208. Dheda, K., J.F. Huggett, S.A. Bustin, M.A. Johnson, G. Rook, and A. Zumla, *Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR*. *Biotechniques*, 2004. **37**(1): p. 112-4, 116, 118-9.
 209. Sturzenbaum, S.R. and P. Kille, *Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2001. **130**(3): p. 281-9.
 210. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman, *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. *Genome Biol*, 2002. **3**(7): p. Research0034.
 211. Ferreira, E. and M.J. Cronje, *Selection of suitable reference genes for quantitative real-time PCR in apoptosis-induced MCF-7 breast cancer cells*. *Mol Biotechnol*, 2012. **50**(2): p. 121-8.
 212. Ginzinger, D.G., *Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream*. *Experimental Hematology*, 2002. **30**(6): p. 503-512.
 213. Cobleigh, M.A., B. Tabesh, P. Bitterman, J. Baker, M. Cronin, M.L. Liu, R. Borchik, J.M. Mosquera, M.G. Walker, and S. Shak, *Tumor gene expression and prognosis in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(24 Pt 1): p. 8623-31.
 214. Paik, S., S. Shak, G. Tang, C. Kim, J. Baker, M. Cronin, F.L. Baehner, M.G. Walker, D. Watson, T. Park, W. Hiller, E.R. Fisher, D.L. Wickerham, J. Bryant, and N. Wolmark, *A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(27): p. 2817-26.

215. Dawson, S.J., N. Makretsov, F.M. Blows, K.E. Driver, E. Provenzano, J. Le Quesne, L. Baglietto, G. Severi, G.G. Giles, C.A. McLean, G. Callagy, A.R. Green, I. Ellis, K. Gelmon, G. Turashvili, S. Leung, S. Aparicio, D. Huntsman, C. Caldas, and P. Pharoah, *BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received*. Br J Cancer, 2010. **103**(5): p. 668-75.
216. Smerage, J.B., G.T. Budd, G.V. Doyle, M. Brown, C. Paoletti, M. Muniz, M.C. Miller, M.I. Repollet, D.A. Chianese, M.C. Connelly, L.W. Terstappen, and D.F. Hayes, *Monitoring apoptosis and Bcl-2 on circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer*. Mol Oncol, 2013. **7**(3): p. 680-92.
217. Abdel-Fatah, T.M., C. Perry, P. Dickinson, G. Ball, P. Moseley, S. Madhusudan, I.O. Ellis, and S.Y. Chan, *Bcl2 is an independent prognostic marker of triple negative breast cancer (TNBC) and predicts response to anthracycline combination (ATC) chemotherapy (CT) in adjuvant and neoadjuvant settings*. Ann Oncol, 2013. **24**(11): p. 2801-7.
218. Sudhan, D.R. and D.W. Siemann, *Cathepsin L targeting in cancer treatment*. Pharmacol Ther, 2015. **155**: p. 105-16.
219. Zajc, I., N. Sever, A. Bervar, and T.T. Lah, *Expression of cysteine peptidase cathepsin L and its inhibitors stefins A and B in relation to tumorigenicity of breast cancer cell lines*. Cancer Lett, 2002. **187**(1-2): p. 185-90.
220. Watson, C.J. and P.A. Kreuzaler, *The role of cathepsins in involution and breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2009. **14**(2): p. 171-9.
221. Santamaria, I., G. Velasco, M. Cazorla, A. Fueyo, E. Campo, and C. Lopez-Otin, *Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas*. Cancer Res, 1998. **58**(8): p. 1624-30.
222. Wong, C.H., Z. Wu, and Q. Yu, *CTSL2 is a pro-apoptotic target of E2F1 and a modulator of histone deacetylase inhibitor and DNA damage-induced apoptosis*. Oncogene, 2014. **33**(10): p. 1249-57.
223. Mohamed, M.M. and B.F. Sloane, *Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(10): p. 764-75.
224. Gocheva, V., W. Zeng, D. Ke, D. Klimstra, T. Reinheckel, C. Peters, D. Hanahan, and J.A. Joyce, *Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis*. Genes Dev, 2006. **20**(5): p. 543-56.
225. Gocheva, V. and J.A. Joyce, *Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion*. Cell Cycle, 2007. **6**(1): p. 60-4.
226. CAMA-1 (ATCC® HTB-21™) Characteristics. [cited 2017 11.07.2017]; Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-21.aspx?geo_country=de#characteristics.
227. Fogh, J., W.C. Wright, and J.D. Loveless, *Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors*. J Natl Cancer Inst, 1977. **58**(2): p. 209-14.
228. Gstraunthaler, G. and T. Lindl, *Subkultivierung/ Passagieren*, in *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 2013, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 113-119.
229. Munzone, E., F. Nole, A. Goldhirsch, E. Botteri, A. Esposito, L. Zorzino, G. Curigliano, I. Minchella, L. Adamoli, M.C. Cassatella, C. Casadio, and M.T. Sandri, *Changes of HER2 status in circulating tumor cells compared with the primary tumor during treatment for advanced breast cancer*. Clin Breast Cancer, 2010. **10**(5): p. 392-7.
230. Solomayer, E.F., S. Becker, G. Pergola-Becker, R. Bachmann, B. Kramer, U. Vogel, H. Neubauer, D. Wallwiener, J. Huober, and T.N. Fehm, *Comparison of HER2 status between*

- primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients.* Breast Cancer Res Treat, 2006. **98**(2): p. 179-84.
231. Krawczyk, N., M. Banys, H. Neubauer, E.F. Solomayer, C. Gall, M. Hahn, S. Becker, R. Bachmann, D. Wallwiener, and T. Fehm, *HER2 status on persistent disseminated tumor cells after adjuvant therapy may differ from initial HER2 status on primary tumor.* Anticancer Res, 2009. **29**(10): p. 4019-24.
 232. Zebisch, M., A.C. Kolbl, U. Andergassen, S. Hutter, J. Neugebauer, V. Engelstadter, M. Gunthner-Biller, U. Jeschke, K. Friese, and B. Rack, *Detection of circulating tumour cells on mRNA levels with established breast cancer cell lines.* Biomed Rep, 2013. **1**(2): p. 231-234.
 233. Zebisch, M., A.C. Kolbl, C. Schindlbeck, J. Neugebauer, S. Heublein, M. Ilmer, B. Rack, K. Friese, U. Jeschke, and U. Andergassen, *Quantification of breast cancer cells in peripheral blood samples by real-time rt-PCR.* Anticancer Res, 2012. **32**(12): p. 5387-91.
 234. Raimondi, C., A. Gradilone, G. Naso, B. Vincenzi, A. Petracca, C. Nicolazzo, A. Palazzo, R. Saltarelli, F. Spremberg, E. Cortesi, and P. Gazzaniga, *Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients.* Breast Cancer Res Treat, 2011. **130**(2): p. 449-55.
 235. Wicha, M.S. and D.F. Hayes, *Circulating tumor cells: not all detected cells are bad and not all bad cells are detected.* J Clin Oncol, 2011. **29**(12): p. 1508-11.
 236. Gorges, T.M., I. Tinhofer, M. Drosch, L. Rose, T.M. Zollner, T. Krahn, and O. von Ahsen, *Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition.* BMC Cancer, 2012. **12**: p. 178.
 237. Lecharpentier, A., P. Vielh, P. Perez-Moreno, D. Planchard, J.C. Soria, and F. Farace, *Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer.* Br J Cancer, 2011. **105**(9): p. 1338-41.
 238. Sieuwerts, A.M., J. Kraan, J. Bolt, P. van der Spoel, F. Elstrodt, M. Schutte, J.W. Martens, J.W. Gratama, S. Sleijfer, and J.A. Foekens, *Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells.* J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(1): p. 61-6.
 239. Pramanik, A., A. Vangara, B.P. Viraka Nellore, S.S. Sinha, S.R. Chavva, S. Jones, and P.C. Ray, *Development of Multifunctional Fluorescent-Magnetic Nanoprobes for Selective Capturing and Multicolor Imaging of Heterogeneous Circulating Tumor Cells.* ACS Appl Mater Interfaces, 2016. **8**(24): p. 15076-85.
 240. Payne, R.E., F. Wang, N. Su, J. Krell, A. Zebrowski, E. Yague, X.J. Ma, Y. Luo, and R.C. Coombes, *Viable circulating tumour cell detection using multiplex RNA in situ hybridisation predicts progression-free survival in metastatic breast cancer patients.* Br J Cancer, 2012. **106**(11): p. 1790-7.
 241. Martelotto, L.G., C.K. Ng, S. Piscuoglio, B. Weigelt, and J.S. Reis-Filho, *Breast cancer intra-tumor heterogeneity.* Breast Cancer Res, 2014. **16**(3): p. 210.
 242. Meacham, C.E. and S.J. Morrison, *Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity.* Nature, 2013. **501**(7467): p. 328-37.
 243. Campbell, L.L. and K. Polyak, *Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution?* Cell Cycle, 2007. **6**(19): p. 2332-8.
 244. Turner, N.C. and J.S. Reis-Filho, *Genetic heterogeneity and cancer drug resistance.* Lancet Oncol, 2012. **13**(4): p. e178-85.
 245. Geyer, F.C., B. Weigelt, R. Natrajan, M.B. Lambros, D. de Biase, R. Vatcheva, K. Savage, A. Mackay, A. Ashworth, and J.S. Reis-Filho, *Molecular analysis reveals a genetic basis for the phenotypic diversity of metaplastic breast carcinomas.* J Pathol, 2010. **220**(5): p. 562-73.

246. Navin, N., J. Kendall, J. Troge, P. Andrews, L. Rodgers, J. McIndoo, K. Cook, A. Stepansky, D. Levy, D. Esposito, L. Muthuswamy, A. Krasnitz, W.R. McCombie, J. Hicks, and M. Wigler, *Tumour evolution inferred by single-cell sequencing*. Nature, 2011. **472**(7341): p. 90-4.
247. Navin, N., A. Krasnitz, L. Rodgers, K. Cook, J. Meth, J. Kendall, M. Riggs, Y. Eberling, J. Troge, V. Grubor, D. Levy, P. Lundin, S. Maner, A. Zetterberg, J. Hicks, and M. Wigler, *Inferring tumor progression from genomic heterogeneity*. Genome Res, 2010. **20**(1): p. 68-80.
248. Patani, N., V. Barbashina, M.B. Lambros, A. Gauthier, M. Mansour, A. Mackay, and J.S. Reis-Filho, *Direct evidence for concurrent morphological and genetic heterogeneity in an invasive ductal carcinoma of triple-negative phenotype*. J Clin Pathol, 2011. **64**(9): p. 822-8.
249. Ding, L., M.J. Ellis, S. Li, D.E. Larson, K. Chen, J.W. Wallis, C.C. Harris, M.D. McLellan, R.S. Fulton, L.L. Fulton, R.M. Abbott, J. Hoog, D.J. Dooling, D.C. Koboldt, H. Schmidt, J. Kalicki, Q. Zhang, L. Chen, L. Lin, M.C. Wendl, J.F. McMichael, V.J. Magrini, L. Cook, S.D. McGrath, T.L. Vickery, E. Appelbaum, K. Deschryver, S. Davies, T. Guintoli, L. Lin, R. Crowder, Y. Tao, J.E. Snider, S.M. Smith, A.F. Dukes, G.E. Sanderson, C.S. Pohl, K.D. Delehaunty, C.C. Fronick, K.A. Pape, J.S. Reed, J.S. Robinson, J.S. Hodges, W. Schierding, N.D. Dees, D. Shen, D.P. Locke, M.E. Wiechert, J.M. Eldred, J.B. Peck, B.J. Oberkfell, J.T. Lolofie, F. Du, A.E. Hawkins, M.D. O'Laughlin, K.E. Bernard, M. Cunningham, G. Elliott, M.D. Mason, D.M. Thompson, Jr., J.L. Ivanovich, P.J. Goodfellow, C.M. Perou, G.M. Weinstock, R. Aft, M. Watson, T.J. Ley, R.K. Wilson, and E.R. Mardis, *Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft*. Nature, 2010. **464**(7291): p. 999-1005.
250. Gerlinger, M., A.J. Rowan, S. Horswell, J. Larkin, D. Endesfelder, E. Gronroos, P. Martinez, N. Matthews, A. Stewart, P. Tarpey, I. Varela, B. Phillimore, S. Begum, N.Q. McDonald, A. Butler, D. Jones, K. Raine, C. Latimer, C.R. Santos, M. Nohadani, A.C. Eklund, B. Spencer-Dene, G. Clark, L. Pickering, G. Stamp, M. Gore, Z. Szallasi, J. Downward, P.A. Futreal, and C. Swanton, *Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing*. N Engl J Med, 2012. **366**(10): p. 883-92.
251. Cottu, P.H., J. Asselah, M. Lae, J.Y. Pierga, V. Dieras, L. Mignot, B. Sigal-Zafrani, and A. Vincent-Salomon, *Intratumoral heterogeneity of HER2/neu expression and its consequences for the management of advanced breast cancer*. Ann Oncol, 2008. **19**(3): p. 595-7.
252. Bedard, P.L., A.R. Hansen, M.J. Ratain, and L.L. Siu, *Tumour heterogeneity in the clinic*. Nature, 2013. **501**(7467): p. 355-64.
253. Wallwiener, M., A.D. Hartkopf, S. Riethdorf, J. Nees, M.R. Sprick, B. Schonfisch, F.A. Taran, J. Heil, C. Sohn, K. Pantel, A. Trumpp, and A. Schneeweiss, *The impact of HER2 phenotype of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: a retrospective study in 107 patients*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 403.
254. Ligthart, S.T., F.C. Bidard, C. Decraene, T. Bachelot, S. Delaloge, E. Brain, M. Campone, P. Viens, J.Y. Pierga, and L.W. Terstappen, *Unbiased quantitative assessment of Her-2 expression of circulating tumor cells in patients with metastatic and non-metastatic breast cancer*. Ann Oncol, 2013. **24**(5): p. 1231-8.
255. Ieni, A., V. Barresi, R. Caltabiano, A.M. Cascone, R. Del Sordo, D. Cabibi, P. Zeppa, S. Lanzafame, A. Sidoni, V. Franco, and G. Tuccari, *Discordance rate of HER2 status in primary breast carcinomas versus synchronous axillary lymph node metastases: a multicenter retrospective investigation*. Onco Targets Ther, 2014. **7**: p. 1267-72.
256. Santinelli, A., E. Pisa, D. Stramazzotti, and G. Fabris, *HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy*. Int J Cancer, 2008. **122**(5): p. 999-1004.
257. Schramm, A., T.W. Friedl, F. Schochter, C. Scholz, N. de Gregorio, J. Huober, B. Rack, E. Trapp, M. Alunni-Fabbroni, V. Muller, A. Schneeweiss, K. Pantel, F. Meier-Stiegen, A. Hartkopf, F.A.

- Taran, D. Wallwiener, W. Janni, and T. Fehm, *Therapeutic intervention based on circulating tumor cell phenotype in metastatic breast cancer: concept of the DETECT study program*. Arch Gynecol Obstet, 2016. **293**(2): p. 271-81.
258. Meng, S., D. Tripathy, S. Shete, R. Ashfaq, B. Haley, S. Perkins, P. Beitsch, A. Khan, D. Euhus, C. Osborne, E. Frenkel, S. Hoover, M. Leitch, E. Clifford, E. Vitetta, L. Morrison, D. Herlyn, L.W. Terstappen, T. Fleming, T. Fehm, T. Tucker, N. Lane, J. Wang, and J. Uhr, *HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(25): p. 9393-8.
259. Fehm, T., V. Muller, B. Aktas, W. Janni, A. Schneeweiss, E. Stickeler, C. Lattrich, C.R. Lohberg, E. Solomayer, B. Rack, S. Riethdorf, C. Klein, C. Schindlbeck, K. Brocker, S. Kasimir-Bauer, D. Wallwiener, and K. Pantel, *HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **124**(2): p. 403-12.
260. Fehm, T., O. Hoffmann, B. Aktas, S. Becker, E.F. Solomayer, D. Wallwiener, R. Kimmig, and S. Kasimir-Bauer, *Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(4): p. R59.
261. Swain, S.M., S.B. Kim, J. Cortes, J. Ro, V. Semiglazov, M. Campone, E. Ciruelos, J.M. Ferrero, A. Schneeweiss, A. Knott, E. Clark, G. Ross, M.C. Benyunes, and J. Baselga, *Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study*. Lancet Oncol, 2013. **14**(6): p. 461-71.
262. Hicks, M., E.R. Macrae, M. Abdel-Rasoul, R. Layman, S. Friedman, J. Querry, M. Lustberg, B. Ramaswamy, E. Mrozek, C. Shapiro, and R. Wesolowski, *Neoadjuvant dual HER2-targeted therapy with lapatinib and trastuzumab improves pathologic complete response in patients with early stage HER2-positive breast cancer: a meta-analysis of randomized prospective clinical trials*. Oncologist, 2015. **20**(4): p. 337-43.
263. Carlsson, J., H. Nordgren, J. Sjostrom, K. Wester, K. Villman, N.O. Bengtsson, B. Ostenstad, H. Lundqvist, and C. Blomqvist, *HER2 expression in breast cancer primary tumours and corresponding metastases. Original data and literature review*. Br J Cancer, 2004. **90**(12): p. 2344-8.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell der Metastasenentstehung anhand der epithelial-mesenchymalen Transition .	14
Abbildung 2: Epithelial-mesenchymale Transition und assoziierte Surrogatparameter	15
Abbildung 3: Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion	19
Abbildung 4: Wirkprinzip der TaqMan-Sonde mit Reporter- und Quencher-molekül	20
Abbildung 5: Phasen der Polymerase-Kettenreaktion und Schwellenwertermittlung	21
Abbildung 6: Mathematische Grundlage der Berechnung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode	22
Abbildung 7: Relative Quantifizierung der Genexpression des Östrogenrezeptors in der Konzentrationsreihe	34
Abbildung 8: Relative Quantifizierung der Genexpression des Progesteronrezeptors in der Konzentrationsreihe	35
Abbildung 9: Relative Quantifizierung der Genexpression von Ki-67 in der Konzentrationsreihe	36
Abbildung 10: Relative Quantifizierung der Genexpression von Her2 in der Konzentrationsreihe	37
Abbildung 11: Relative Quantifizierung der Genexpression von Bcl2 in der Konzentrationsreihe.....	38
Abbildung 12: Relative Quantifizierung der Genexpression von Cathepsin L2 in der Konzentrationsreihe	39
Abbildung 13: Relative Quantifizierung der Genexpression von Biomarkern im Modellsystem.....	40
Abbildung 14: Gemittelte Werte der relativen Quantifizierung der Gruppe adjuvanter Brustkrebs- patientinnen vs. Negativkontrolle	43

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Epidemiologische Kennzahlen für Brustkrebs, Deutschland, 2013	3
Tabelle 2: Differenzierungsgrad des Mammakarzinoms nach Elston und Ellis.....	5
Tabelle 3: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms	7
Tabelle 4: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms	8
Tabelle 5: Verwendete Geräte und Hilfsmittel	24
Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	26
Tabelle 8: Verwendete Brustkrebszelllinie.....	27
Tabelle 9: Verwendete TaqMan-Primer der Real Time-Polymerase-Kettenreaktion	27
Tabelle 10: Relative Quantifizierungswerte der Genexpression des Östrogenrezeptors in der Konzentrationsreihe	34
Tabelle 11: Relative Quantifizierungswerte der Genexpression des Progesteronrezeptors in der Konzentrationsreihe	35
Tabelle 12: Relative Quantifizierungswerte von Ki-67 in der Konzentrationsreihe	36
Tabelle 13: Relative Quantifizierungswerte von Her2 in der Konzentrationsreihe	37
Tabelle 14: Relative Quantifizierungswerte von Bcl2 in der Konzentrationsreihe	38
Tabelle 15: Relative Quantifizierungswerte von Cathepsin L2 in der Konzentrationsreihe.....	39
Tabelle 16: Tumorbologische Charakteristika der Primarii adjuvanter Brustkrebspatientinnen	42
Tabelle 17: Gemittelte Werte der relativen Quantifizierung adjuvanter Brustkrebspatientinnen vs. Negativ-kontrolle und Unterschiedsfaktor.....	43
Tabelle 18: Relative Quantifizierungswerte und Patientendaten	44
Tabelle 19: Hohe RQ-Werte adjuvanter Brustkrebspatientinnen.....	45
Tabelle 20: Niedrige RQ-Werte adjuvanter Brustkrebspatientinnen.....	45
Tabelle 21: RQ-Werte und Triple-Negativität	46
Tabelle 22: Patientinnen mit erhöhter Genexpression von Cathepsin L2	46
Tabelle 23: RQ-Werte und Ki-67-Nachweis.....	47
Tabelle 24: RQ-Werte und Her2-Switch	48
Tabelle 25: p-Werte der statistischen Auswertung der RQ-Werte in Patientensubgruppen	49

11 Ethikvotum

17.Sep.2012 09:26 +089 5160 5192

Ethikkommission der LMU

#2467 P.001 / 004



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

ETHIKKOMMISSION BEI DER LMU MÜNCHEN



Ethikkommission - Pettenkoferstr. 8 - 80336 München

Herrn
Prof. Dr. Udo Jeschke
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde
Maistr. 11
80337 München

Vorsitzender:
Prof. Dr. W. Eisenmenger
Telefon+49 (0)89 5160 - 5191
Telefax+49 (0)89 5160 - 5192
Ethikkommission@
med.uni-muenchen.de

www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de

Postanschrift:
Pettenkoferstr. 8a
D-80336 München

Hausanschrift:
Pettenkoferstr. 8
D-80336 München
München, 10.05.2012 EM /sc

Titel:	Krebsfrüherkennung bei gynäkologischen Tumoren
Antragsteller:	Prof. Dr. U. Jeschke, Dr. U. Andergassen
Projekt- Nr.	148-12

Sehr geehrter Herr Kollege Jeschke,
sehr geehrter Herr Kollege Andergassen,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 06.05.2012 mit der Beantwortung unserer Fragen
bzw. Erfüllung der Auflagen und den noch ausstehenden bzw. überarbeiteten
Unterlagen (EK- Antrag, Patienten- Information u. – Einverständniserklärung).

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche
Unbedenklichkeit zuerkennen.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung
des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die
Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern
verbleibt.

Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen. Für Ihre Studie wünsche
ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen


Prof. Dr. W. Eisenmenger
Vorsitzender der Ethikkommission

N/ Mitglieder der Ethikkommission

P.S.: Bitte beachten Sie die aktuellen Richtlinien für Anträge an die Ethikkommission.
Internetadresse: www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de

Mitglieder der Kommission:
Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. G. Paumgartner (stellv. Vorsitzender), PD
Dr. Th. Beierl, Prof. Dr. H. U. Galiwac, Prof. Dr. D. Kunze, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. H. M. Müller, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K.
Hahn, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. Ch. Zach

12 Veröffentlichung

Publikation:

New Marker Genes for Real-Time PCR-based Detection of Circulating Tumour Cells from Blood of Breast Cancer Patients

Kölbl A.C., Bräuer D., Hutter S., Rack B., Friese K., Jeschke U., Andergassen U.
(Anticancer Res. 2016 Jun;36(6):3211-6.)

Kongressbeiträge:

Neue Markergene für die Real-Time-PCR-basierte Detektion von zirkulierenden Tumorzellen im Blut von Patientinnen mit Mammakarzinom

Mumm J.N., Bräuer D., Kölbl A.C., Friese K., Jeschke U., Andergassen U.
(Poster, 16. Hamburger Symposium über Tumormarker, 19.-21.10.2014)

RT-qPCR-Markergene zum Nachweis und zur Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen im Blut von Brustkrebspatientinnen

D. Bräuer, U. Andergassen, A.C. Kölbl, K. Friese, U. Jeschke
(Poster, 88. Tagung der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 16.-19.07.2014)

13 Danksagung

Ich danke zuvorderst Herrn Professor Udo Jeschke vielmals für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dissertation sowie die Betreuung und Unterstützung, gerade für wichtige Impulse bei Schwierigkeiten während der experimentellen Phase der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Andergassen für seine kompetente, enge und engagierte Betreuung, die mir die Heranführung an die Forschung in der Medizin ermöglichte, wofür ich fortwährend größte Dankbarkeit empfinden werde. Das Bemühen um die Übertragung von Wissensfortschritt in den Patientenalltag lebte er mir dabei als großes Vorbild in der Rolle des Universitätsmediziners vor.

Gleichfalls gilt mein größter Dank Frau Doktor Alexandra Kölbl für ihre fundierte wie intensive Betreuung. Über die Vermittlung der Methodik, die Auswertung der Ergebnisse wie auch die Erstellung der Dissertation hinweg, erwies sie sich stets als hervorragende Ansprechpartnerin all meiner Anliegen und Fragen. Herzlichsten Dank!

Zudem danke ich dem Team des tumorimmunologischen Labors der Frauenklinik in der Maistraße, voran Frau Leonie Majunke, Frau Alvera Rengel-Puertas sowie Frau Beate Zill, für all die Ratschläge und Hilfestellungen, die das Gelingen der Arbeiten im Labor erleichterten.

Darüberhinaus danke ich meinen Mitstreiterinnen, den Doktorandinnen Frau Anja Vogl und Frau Rebekka Wellens, für ihre Unterstützung und Freundschaft. Ich bin überaus dankbar für diese Verbindung.

Weiterer Dank gilt allen in das Forschungsprojekt eingeschlossenen Patientinnen und freiwilligen Blutspenderinnen für die Kontrollgruppe beziehungsweise Vorversuche, ohne deren Bereitschaft zur Mitwirkung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt auch meinem Mentor des Max Weber-Programms, Herrn Professor Alexander Gerbes, für seine motivierenden Worte und seinen Ratschlag.

Gleichsam möchte ich meinem Onkel, Herrn Doktor Detlev Werner, großen Dank aussprechen. Er lebte mir schon vor Beginn meines Studiums das Interesse und die Begeisterung für das Fach der Gynäkologie und Geburtshilfe vor. Ich danke von Herzen für die Begleitung meines Weges!

Schließlich danke ich meinen Eltern für all die Liebe und Unterstützung, die sie mir im Laufe meines bisherigen Lebens zuteil haben werden lassen. Ihnen sei diese Arbeit gewidmet.

14 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Erprobung von Real-Time-PCR-Genmarkern zur Detektion zirkulierender Tumorzellen im
peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 20.10.2018

Dominik Michael Bräuer